

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 03/064453 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 5/00 (74) Anwalt: SAVIC, Bojan; Frohwitter, Patent- und Rechtsanwältin, Postfach 86 03 68, 81630 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00265
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Januar 2003 (27.01.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 04 210.1 27. Januar 2002 (27.01.2002) DE
102 03 862.7 27. Januar 2002 (27.01.2002) DE
102 09 064.5 28. Februar 2002 (28.02.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): VIROMICS GMBH [DE/DE]; Karl-Liebke-Strasse 22, 07743 Jena (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHUBERT, Ulrich [DE/DE]; Jenaische Strasse 51, 07407 Uhlstädt (DE). SCHUBERT, Evelyn [DE/DE]; Jenaische Strasse 51, 07407 Uhlstädt (DE). TESSMER, Uwe [DE/DE]; Roonstrasse 39, 20253 Hamburg (DE). LUCAS, Kerstin [DE/DE]; Heussweg 87, 20255 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TROJAN INHIBITORS, METHOD FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: TROJANISCHE INHIBITOREN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to active inhibitors - trojan inhibitors (TI) - and the use thereof in the form of specifically shaped trojan proteasome-inhibitors (TPI) or trojan assembling-inhibitors (TAI), such as proteasome-and assembling-inhibitors which are, initially, inactive and are only activated in the target cell by means of a specific protease for the target cell. According to the invention, said inhibitor can be used in the treatment of viral infections, whereby a virus-specific protease is expressed, particularly in HIV-infections and AIDS-therapy, and optionally in the inhibition of the release, maturing and replication of filo viruses, and in the treatment and prevention of viral haemorrhagic fever (activated by Ebola or Marburg-viruses) and in the therapy of tumoral diseases, whereby the tumour cells are characterised by a specific protease.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft aktivierbare Inhibitoren - Trojanische Inhibitoren (TI) - und ihre Verwendung in Gestalt spezifischer Trojanischer Proteasom-Inhibitoren (TPI) oder Trojanischer Assemblierungs-inhibitoren (TAI), d.h. Proteasom- und Assemblierungs-Inhibitoren, die zunächst inaktiv sind und erst in der Zielzelle durch eine für die Zielzelle spezifische Protease aktiviert werden. Anwendungsgebiete sind einerseits die Behandlung von viralen Infektionen, bei denen eine Virus-spezifische Protease exprimiert wird, vor allem von HIV-Infektionen und in der AIDS-Therapie, ebenfalls die Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Filoviren, die Behandlung und Vorbeugung von viralem hämorrhagischen Fieber (ausgelöst durch Ebola- oder Marburg-Viren) sowie andererseits die Therapie von Tumorkrankungen, bei denen sich die Tumorzellen durch eine spezifische Protease auszeichnen.

WO 03/064453 A2

Trojanische Inhibitoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Beschreibung

- 5 [0001] Die Erfindung betrifft aktivierbare (trojanische) Inhibitoren – Trojanische Inhibitoren (TI) – ihre Herstellung und ihre Verwendung in Gestalt spezifischer (trojanischer) Proteasom-Inhibitoren – Trojanische Proteasom-Inhibitoren (TPI) – und Trojanischer Assemblierungs-Inhibitoren (TAI), d.h. Proteasom- und Assemblierungs-Inhibitoren, die zunächst inaktiv sind und erst in der Zielzelle durch eine für die Zielzelle spezifische Protease aktiviert werden.
- 10 Anwendungsgebiete sind einerseits die Behandlung von viralen Infektionen, bei denen eine Virus-spezifische Protease exprimiert wird, vor allem von HIV-Infektionen und in der AIDS-Therapie, ebenfalls die Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Filoviren und die Behandlung und Vorbeugung von Infektionen mit virales hämorrhagisches Fieber auslösenden Ebola- und Marburg-Viren sowie andererseits die Therapie von
- 15 Tumorerkrankungen, bei denen sich die Tumorzellen durch eine spezifische Protease auszeichnen.

Charakteristik des bekannten Standes

Einleitung

- 20 [0002] Seit Anfang der 80er Jahre hat die Pandemie des erworbenen Immundefizienz-Syndroms (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS – Abkürzungsverzeichnis hinter den Ausführungsbeispielen). Millionen von HIV-infizierten Menschen mit einer heimtückischen, multisystemischen und bislang ultimativ unheilbaren Krankheit konfrontiert. Obwohl bei der Behandlung HIV-Infizierter in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt wurden, ist eine
- 25 vollständige Heilung oder eine wirksame Schutzimpfung bisher nicht möglich.

- [0003] Die HIV-Infektion ist allgemein charakterisiert durch einen Verlust von CD4⁺-T-Helferlymphozyten (Th), welche die hauptsächlichen Wirtszellen für HIV darstellen. Die Th-Zellen ebenso wie CD4⁺-Monozyten/Makrophagen, einer weiteren Targetzelle für HIV *in vivo*, üben wichtige Funktionen in der zellulären und humoralen Immunantwort aus. Die HIV-
- 30 induzierte Schwächung des Immunsystems geht mit einem Verlust der Kontrolle der HIV-Replikation im Organismus einher, welche zwangsläufig zu den bekannten Symptomen des erworbenen Immundefizienz-Syndroms (AIDS) führt (für Review siehe Rowland-Jones *et al.*, 2001).

[0004] Trotz einer potenten Immunantwort zu Beginn der HIV-Infektion kann das Immunsystem eine bereits etablierte HIV-Infektion nicht mehr eliminieren. Mit der Ausnahme von wenigen "Langzeit-Überlebenden" führt die HIV-Infektion ohne antiretrovirale Behandlung unweigerlich zum AIDS-Stadium. Für die Therapie einer bereits etablierten HIV-Infektion oder zum Schutz vor einer systemischen Manifestierung einer HIV-Infektion unmittelbar nach Aufnahme des Virus sind verschiedene anti-retrovirale Medikamente im Einsatz. Sie stellen im wesentlichen Substanzen dar, welche die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) sowie Protease (PR) hemmen. Es hat sich gezeigt, dass eine Kombination von RT- und PR-Inhibitoren signifikant die Virusbelastung in HIV-Infizierten sowie die Morbidität und die Mortalität einer AIDS-Erkrankung reduzieren kann, jedoch erschweren das Auftreten von multi-Medikamenten-resistenten HIV-Varianten sowie die Toxizität und damit verbundene Unverträglichkeit von RT- und PR-Inhibitoren die ständige Verabreichung dieser klassischen anti-retroviralen Medikamente über einen längeren Zeitraum einer chronischen Erkrankung wie AIDS (für Review siehe Miller und Hazuda, 2001). Weitere neue Entwicklungen von Medikamenten zielen auf Prozesse des Viruseintritts sowie der chromosomalen Integration der viralen DNA. Neben dem Problem der Unverträglichkeit besteht die hauptsächliche Limitierung dieser Medikamente, die gegen ein virales Target gerichtet sind, in der enormen, bis 10^6 -Mal höheren Mutationsrate von HIV (verglichen mit der Replikation humaner DNA). Der dadurch bedingte Polymorphismus führt unweigerlich und in relativ kurzer Zeit zum Auftreten von HIV-Mutanten, die gegenüber einzelnen oder sogar kombinierten anti-HIV-Therapeutika, insbesondere der HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy – Patentschrift WO 00/33654), resistent sind (für Review siehe Miller und Hazuda, 2001).

[0005] Das Ziel der weiteren Forschung besteht damit in der Identifizierung von zellulären Angriffspunkten ("Targets") für eine anti-retrovirale Therapie. Dies betrifft zelluläre Faktoren, Enzyme oder komplexe Mechanismen, die für die Replikation von HIV in der Wirtszelle essentiell sind und selektiv manipuliert werden können, ohne die Vitalität des Gesamtorganismus wesentlich zu beeinträchtigen. Als bislang einzige anti-retrovirale Strategie mit einem zellulären Target wurde unlängst von Schubert et al. (2000) beschrieben, dass Proteasom-Inhibitoren späte Prozesse im Replikationszyklus – und zwar die Freisetzung, Reifung und Replikation – von HIV-1 und HIV-2 blockieren. Bestimmte Proteasom-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Studien (Phase I und II) auf ihre toxikologischen Werte sowie ihre Wirksamkeit in Patienten mit Krebs und Autoimmunerkrankungen getestet.

[0006] Das Proteasom als die hauptsächliche proteolytische Komponente ist in allen eukaryontischen Zellen für die Aufrechterhaltung der wesentlichen zellphysiologischen Prozesse

essentiell und übt dadurch vitale Funktionen im Zellmetabolismus aus. Eine vollständige Blockierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway ist auf Dauer mit dem Leben einer Zelle und damit des Gesamtorganismus nicht zu vereinbaren. Die klinische Anwendung von Proteasom-Inhibitoren ist daher zwangsläufig an die Einhaltung eines genau definierten "therapeutischen Windows" gebunden. Dies bedeutet, dass nur für einen beschränkten Zeitraum und auch nur reversibel ein bestimmter Prozentsatz aller Proteasomen und dabei möglichst auch nur eine der drei hauptsächlichen proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms blockiert werden können.

Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Pathway

10 [0007] Proteasomen sind multikatalytische und multi-Subunit Enzymkomplexe, die ca. 1% der Gesamt-Zellproteine darstellen und als die hauptsächliche proteolytische Komponente im Zellkern und Zytosol aller eukaryotischen Zellen vorkommen. Proteasomen üben eine vitale Rolle in vielfältigen Funktionen des Zellmetabolismus aus. Die hauptsächliche Funktion von Proteasomen ist die Proteolyse von missgefalteten, nicht-funktionellen oder für den schnellen
15 Abbau bestimmten, in der Regel regulatorischen Proteinen. Eine weitere Funktion des proteasomalen Abbaus einer Vielzahl von zellulären oder viralen Proteinen ist die Generierung von Peptidliganden für Major Histokompatibilitäts-Klasse-I-Moleküle, welche für die T-Zell-vermittelte Immunantwort notwendig ist (für Review siehe Rock und Goldberg, 1999).

[0008] Proteasom-Targets werden in der Regel für den proteasomalen Abbau durch die
20 Anheftung von oligomeren Formen von Ubiquitin (Ub) markiert. Ub ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein, das kovalent an Targetproteine via Isopeptidbindung zwischen dem COOH-Terminus und der ϵ -NH₂-Gruppe von Lysin-Seitenketten gekoppelt wird, entweder am Targetprotein oder an Ub-Moleküle selbst, die bereits an das Targetprotein geheftet sind. Das Ergebnis der Konjugation von Ub-Molekülen ist die Formierung von sogenannten poly-Ub-
25 Ketten. Allgemein sind Multimere von vier Ub-Molekülen notwendig, um als Signal für die proteasomale Degradation zu fungieren. Die Ubiquitinylierung selbst ist reversibel, und Ub-Moleküle können durch eine Vielzahl von Ub-Hydrolasen von dem Targetmolekül wieder entfernt werden. Die Verbindung zwischen der Ubiquitinylierung von Targetproteinen und der proteasomalen Proteolyse wird allgemein als Ubiquitin/Proteasom-System (UPS) bezeichnet (für
30 Review siehe Rock und Goldberg, 1999; Herskho und Ciechanover, 1998).

[0009] Das 26S Proteasom ist ein 2.5 MDa großer Multienzym-Komplex, der aus ca. 31 Untereinheiten besteht. Die proteolytische Aktivität des Proteasom-Komplexes wird durch eine zylinderförmige 700 kDa große und aus vier übereinander liegenden Ringen bestehende Core-Struktur, dem 20S Proteasom, realisiert. Das 20S Proteasom bildet einen aus 14 nicht identischen

Proteinen bestehenden komplizierten Multienzymkomplex, der in zwei α - und zwei β -Ringen in einer $\alpha\beta\alpha$ -Reihenfolge angeordnet ist. Die Substratspezifität des 20S Proteasom umfasst drei wesentliche proteolytische Aktivitäten: Trypsin-, Chemotrypsin- und Postglutamyl-Peptid hydrolysierende (PGPH) oder auch Kaspase-ähnliche Aktivitäten, die in den β -Untereinheiten Z, Y und Z lokalisiert sind. Das 20S Proteasom degradiert in vitro denaturierte Proteine unabhängig von deren Poly-Ubiquitinylierung. Dagegen werden in vivo enzymatische Aktivitäten des 20S Proteasoms durch Anlagerung der 19S regulatorischen Untereinheiten reguliert, welche zusammen das aktive 26S Proteasom-Partikel bilden. Die 19S regulatorischen Untereinheiten sind bei der Erkennung von poly-ubiquitinylierten Proteinen sowie bei der Entfaltung von Targetproteinen beteiligt. Die Aktivität des 26S Proteasom ist ATP-abhängig und degradiert fast ausschließlich nur poly-ubiquitinylierte Proteine (für Review siehe Hershko und Ciechanover, 1998).

Bedeutung des Ubiquitin/Proteasom-Systems in der Pathogenese klinisch relevanter Krankheiten

[0010] Die enge Verknüpfung des UPS mit zellulären Mechanismen erklärt die Bedeutung dieses Systems für zahlreiche pathologische Mechanismen, von denen bislang nur ein geringer Teil bekannt ist (für Review siehe Ciechanover et al., 2000). Eine wichtige Rolle in der Entstehung von malignen Tumoren spielt das Tumorsuppressor-Protein p53. Beispielsweise ist der Level an p53 in besonders aggressiven Formen von zervikalen Karzinomen extrem niedrig, die durch bestimmte Hochrisiko-Isolate des Humanen Papilloma-Virus (HPV) ausgelöst werden. Das HPV onco-Protein E6 induziert den Abbau des Suppressorproteins p53 via UPS.

[0011] Bei der Entstehung von colorektalem Cancer spielt β -Catenin, ein via UPS regulierter zellulärer Faktor, eine wichtige Rolle in der Signal-Transduktion und Differenzierung von colorektalem Epithelium. Außerdem besteht eine Korrelation zwischen dem Level an p27, einem G1 Cyclin CDK-Inhibitor und dem Entstehen von besonders aggressivem colorektalem Cancer und Brustkrebs. Der Abbau von p27 durch den Ubiquitin/Proteasom-Pathway ist entscheidend für den Übergang von G1- zur S-Phase während der Zellteilung.

[0012] Eine Rolle des UPS bei Erbkrankheiten ist bekannt, zum Beispiel für den Pathomechanismus von Cystischer Fibrosis (proteasomaler Abbau des Transmembran-Regulators CFTR), dem Angelmans-Syndrom (Funktion der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP) sowie dem Liddle-Syndrom (Ubiquitinylierung und lysosomale Degradation des Amilorid-sensitiven Epithelium Natrium-Ionenkanals).

[0013] Ebenfalls bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt das UPS eine entscheidende Rolle: Über die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten in pathologischen Läsionen bei Alzheimer

und Parkinson wurde berichtet. Bei Huntington³ akkumulieren die Proteine Huntingtin und Ataxin in Proteasom-aktiven nukläeren Strukturen im Zellkern.

[0014] Eine zentrale Funktion übt das UPS bei Erkrankungen des Immunsystems aus. Zum einen ist der 26S Proteasom-Komplex die hauptsächliche Protease in der MHC-I-
5 Antigenprozessierung, und zum anderen kann die Aktivität des Proteasoms selbst sowohl durch γ -Interferon induzierbare katalytische β -Untereinheiten als auch durch die regulatorische Untereinheit PA28 manipuliert werden. Viele entzündliche und immunologische Krankheiten stehen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher verschiedene Gen-
Funktionen in der Immunantwort reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B, die durch
10 Ubiquitinylierung und spezifische Spaltung eines Vorläuferproteins durch das Proteasom gesteuert wird, führt zur erhöhten Expression von verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, entzündlichen und Stress-Response-Proteinen sowie Immunrezeptoren.

[0015] Diese Zusammenhänge erklären das breite Interesse an einer pharmakologischen Anwendung von Substanzen, die das UPS regulieren.

15

Proteasom-Inhibitoren

[0016] Verschiedene Substanzklassen sind als Proteasom-Inhibitoren bekannt. Es sind zum einen chemisch modifizierte Peptidaldehyde wie der Tripeptidaldehyd N-carbobenzoxyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (zLLL), das auch als MG132 bezeichnet wird sowie das um den Faktor 10
20 wirksamere Borsäure-Derivat MG232. Das zLLL und davon abgeleitete Derivate blockieren das Proteasom reversibel durch Ausbildung einer transienten Hemiacetal-Struktur mit der katalytisch aktiven Threonin-Hydroxyl-Seitenkette in Position 1 der β -Untereinheit des 26S Proteasoms. Ähnlich zu zLLL wurde eine weitere Klasse von modifizierten Peptiden als Proteasom-Inhibitoren, Peptid-Vinyl-Sulfone, beschrieben (für Review siehe Elliott und Ross, 2001).

25 [0017] Natürlich vorkommende Substanzen, isoliert aus Mikroorganismen, sind Lactacystin (LC) (Fenteany et al., 1995) aus Streptomyceten sowie Epoxomycin aus Aktinomyzeten (Meng et al., 1999a,b). LC ist ein hoch spezifischer und wirksamer Proteasom-Inhibitor, der das Proteasom durch Transesterifizierung und Alkylierung der Threonin-Seitenkette in der β -Untereinheit irreversibel inaktiviert (Fenteany et al., 1995). LC ist daher ein irreversibler, kovalent wirkender
30 Proteasom-Inhibitor, der hauptsächlich die Chymotrypsin und die Trypsin-ähnlichen Aktivitäten des 26S Proteasom-Partikels blockiert (Fenteany et al., 1995). LC hat keine Peptid-Grundstruktur, sondern besteht aus einem γ -Lactam-Ring, einem Cystein und einer Hydroxybutyl-Gruppe. LC selbst inhibiert nicht das Proteasom. Vielmehr wird in wässriger Lösung der N-Acetyl-Cystein-Rest hydrolysiert. Das Resultat ist die Bildung eines Clastolactacystein β -

Lactons. Diese Lacton-Struktur ist in der Lage, Zellmembranen zu penetrieren. Nach Zellaufnahme kommt es zum nukleophilen Angriff des β -Lacton-Rings und anschließender Transesterifizierung der Threonin1-Hydroxyl-Gruppe der β -Untereinheit. Ein weiterer Proteasom-Inhibitor ist das natürlich vorkommende Epoxyketon Epoxomycin. Hinsichtlich der Spezifität für das 26S Proteasom und Wirksamkeit ist Epoxomycin der bislang wirksamste von allen bekannten natürlich vorkommenden Proteasom-Inhibitoren (Meng et al., 1999).

[0018] Eine weitere und sehr potente Klasse an synthetischen Proteasom-Inhibitoren sind Borsäure-Peptid-Derivate, insbesondere die Verbindung Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure mit dem Namen "PS-341". PS-341 ist sehr stabil unter physiologischen Bedingungen und ist bioverfügbar nach intravenöser Applikation (Adams und Stein, 1996; Adams et al., 1996, US 1448.012TW01). Die besondere Wirksamkeit von PS-341 als Proteasom-Inhibitor wird vermutlich durch die sehr stabile Bindung zwischen Borsäure- und Hydroxyl-Gruppe der katalytisch aktiven Seitenkette von Thr1 in der aktiven β -Untereinheit des 20S-Proteasoms ($K_i = 0.6$ nM) realisiert (Adams und Stein, 1996). Außer dem Proteasom ist bislang keine zelluläre Protease bekannt, die durch PS-341 beeinflusst wird. Verschiedene Borsäure-Peptid-Derivate wurde auf Wirkung als Proteasom-Inhibitor bereits getestet (Adams et al., 1998). Dabei wurde festgestellt, dass Leucin bevorzugt in P1-Position, und relativ große hydrophobe Seitenketten, wie zum Beispiel Naphthylalanin, in P2 und P3 die Wirksamkeit und den K_i -Wert des Inhibitors verbessern (Adams et al., 1998).

20

Assemblierung und Freisetzung von Retroviren

[0019] Die Assemblierung und die Freisetzung von Retroviren allgemein, und speziell HIV-1, wird von dem viralen Hauptstrukturprotein, dem Gag-Protein, gesteuert, welches nach Synthese an die Zellmembran transportiert wird, wo es ein membranumhülltes sphärisches Partikel (das Virus-Bud) bildet. Nach Abschnürung von der Zellmembran, dem Virusbudding, durchlaufen die freigesetzten Virionen eine proteolytische Reifung (auch Maturation genannt). Im Falle von HIV-1 wird dabei das Gag-Vorläuferprotein Pr55^{Gag} von der viralen Protease in die reifen Virusproteine Matrix (p17^{MA}), Kapsid (p24^{CA}), Nucleokapsid (p15^{NC}) sowie ein 52 Aminosäuren kurzes p6^{Gag}-Protein gespalten (für Review siehe Freed, 1998). In p6^{Gag} ist die Tetrapeptid-Sequenz P-T-A-P als ein hochkonserviertes Sequenzmotiv enthalten, welches für späte Prozesse der Virusassemblierung essentiell ist. Dieses Motiv wird daher auch als "Late" oder L-Domäne bezeichnet. Mutationen in der L-Domäne von p6^{Gag} führen meist zu einem Budding Arrest.

[0020] Grundsätzlich kann die Freisetzung von membranumhüllten Viren, und so auch im Fall von HIV, als eine Knospung und damit als eine Fusion und Abtrennung der Zellmembran von der

Virusmembran verstanden werden. Für diesen geordneten Prozess der Assemblierung, dem Budding und der Membranabschnürung, welcher in seiner komplexen Natur der Virusfreisetzung noch nicht ganz verstanden ist, sind eine Reihe von zellulären Faktoren beteiligt (Martin-Serrano et al., 2001). Zu dieser zellulären Maschinerie zählen Komponenten des "Vacular protein sorting" (Vps) pathway wie beispielsweise das Ubiquitin-ähnliche Protein Tsg 101 (human tumor susceptibility gene 101) sowie Vps4 (Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001) und die Ub-Ligasen der Nedd4 Familie (Strack et al. 2000).

[0021] Es ist gezeigt worden, dass Proteasom-Inhibitoren die Assemblierung, Freisetzung und die Reifung von HIV-1 und HIV-2 in einer L-Domäne abhängigen Art und Weise blockieren (Schubert et al., 2000).

[0022] Konkret bewirken Proteasom-Inhibitoren eine Reduktion der Menge an freien Ub in der Wirtszelle und verhindern dadurch unspezifisch die Mono-Ubiquitinierung von p6Gag (Schubert et al., 2000; Vogt 2000). Nachteilig für einen therapeutischen Einsatz von Proteasom-Inhibitoren als anti-retrovirale Medikamente ist jedoch die Tatsache, dass die Applikation von Inhibitoren dieses für zahlreiche Zellfunktionen essentiellen Ub-Proteasom-Systems zahlreichen für die Lebensfähigkeit der Zellen essentielle Funktionen wie z.B. Zellteilung, Apoptose, Zellaktivierung blockieren. Bei einem therapeutischen Einsatz von Proteasom-Inhibitoren muss daher mit verschiedenen Nebenwirkungen gerechnet werden. Die Verwendung eines spezifischen L-Domäneninhibitors, welcher selektiv nur die Funktion von L-Domänen im Prozess der Virusassemblierung inhibiert, ohne dabei andere Zellfunktionen zu beeinträchtigen, wurde bislang nicht beschrieben. Bisher sind keine Inhibitoren bekannt, welche spezifisch die Funktion von L-Domänen und insbesondere deren Wechselwirkung mit zellulären Faktoren blockieren.

Klinische Applikation von Proteasom-Inhibitoren

[0023] Der 26S Proteasom-Komplex als die hauptsächliche zelluläre Protease ist für vielfältige Zellprozesse von wesentlicher Bedeutung. Die Hemmung der Proteasom-Aktivität kann daher zu Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus, der Transkription, der gesamten zellulären Proteolyse, sowie der MHC-I Antigenprozessierung führen (für Review siehe Ciechanover et al., 2000). Der Proteasom-Komplex übt somit essentielle Zellfunktionen aus und ist für die Zellvitalität unverzichtbar. Eine dauerhafte Inhibierung aller enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms ist mit dem Leben einer Zelle und damit des Gesamtorganismus nicht vereinbar.

[0024] Es zeigt sich jedoch, dass neuartige reversibel wirkende Proteasom-Inhibitoren selektiv einzelne proteolytische Aktivitäten des 26S Proteasoms inhibieren, ohne dabei andere zellulären Proteasen zu beeinflussen. Die Zytotoxizität solcher Inhibitoren ist daher wesentlich geringer im

Vergleich zu den relativ unspezifisch wirkenden Peptidaldehyden wie zum Beispiel zLLL. Erste klinische Studien mit Proteasom-Inhibitoren (Adams et al., 1999) verdeutlichen, dass diese Substanzklasse ein enormes Potential als Pharmaka mit einer vielfältiger Anwendungsbasis enthält (für Review siehe Elliot und Ross, 2001).

- 5 [0025] Die Bedeutung von Proteasom-Inhibitoren als ein neues therapeutisches Prinzip hat in den vergangenen Jahren eine zunehmende Aufmerksamkeit erfahren, insbesondere bei Behandlung von Krebs und entzündlichen Erkrankungen (für Review siehe Elliot und Ross, 2001). Bislang ist der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren für die breite klinische Anwendung am Menschen noch nicht zugelassen. Es mehren sich jedoch Berichte in der Fachliteratur darüber, dass in jüngster
- 10 Zeit die pharmazeutische Industrie intensiv an der Entwicklung von neuen Medikamenten auf der Basis von in vivo-verträglichen Proteasom-Inhibitoren arbeitet. Einige Beispiel seien hierzu angeführt: Die Firma "Millennium Inc." (Cambridge, MA, USA) arbeitet nach Übernahme der Firma "ProScript Inc." an der Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren für entzündungshemmende, immunmodulatorische und antineoplastische Therapien, insbesondere an
- 15 Borsäure-Derivaten von Di-Peptiden, und dabei insbesondere an der Verbindung PS-341 (Adams et al., 1999). Die orale Applikation von PS-341 hat im Ratten-Modell eine entzündungshemmende Wirkung in Streptokokken-induzierter Polyarthrit und Leber-Entzündung (Palombella et al., 1998). Im Maus-Modell zeigt PS-341 anti-neoplastische Wirkung gegen Lungenkarzinom und hat außerdem eine additive Wirkung in Verbindung mit Zytostatika
- 20 (Teicher et al., 1999). In vitro Versuche demonstrieren eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber soliden humanen Ovarien- und Prostata-Tumorzellen (Frankel et al., 2000). Phase I klinische Studien an PS-341 demonstrieren eine gute Bio-Verfügbarkeit und pharmakokinetisches Verhalten (Lightcap et al., 2000).

- [0026] Eine weitere klinische Anwendung von Proteasom-Inhibitoren, insbesondere solche, die
- 25 von der Firma Millennium Inc. entwickelt wurden, deutet sich bei entzündlichen und Auto-Immunerkrankungen an. Schmerzen, Schwellungen und Gewebeerstörung sind Erscheinungen verbunden mit entzündlichen, inflammatorischen Prozessen. Diese werden allgemein ausgelöst durch eine Kaskade der Zytokin- und Chemokin-Produktion sowie der Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen. Eine zentrale Stellung in der Regulation dieser Prozesse
- 30 nimmt der Transkriptionsfaktor NF- κ B ein. Dieser ist notwendig ist für die Expression einer Reihe von pro-inflammatorischen Faktoren. NF- κ B, als ein Vertreter der Rel-Proteine, besteht aus einem Heterodimer von p50 und p65 (RelA) Untereinheiten (für Review siehe Baldwin, 1996). In ruhenden Zellen ist NF- κ B im Zytosol lokalisiert und zwar in einer latenten, inaktiven Form, garantiert durch die Bindung an den inhibitorischen Faktor I κ B. Dieser maskiert das

nukleäre Lokalisationssignal im p50/p65 Heterodimer. Signale der Zellaktivierung, zum Beispiel Zytokine oder virale Infektionen lösen die Phosphorylierung und poly-Ubiquitinylierung von I κ B und damit die Aktivierung von NF- κ B aus. Nach Aktivierung von NF- κ B kommt es zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo NF- κ B die Transkription von verschiedenen Genen, vor allem die von Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen stimuliert. Diese Faktoren sind in der Summe involviert in der Regulation von immunologischen und inflammatorischen Prozessen. Durch Proteasom-Inhibitoren kann der Abbau von I κ B und somit die Aktivierung von NF- κ B blockiert werden (Palombella et al., 1994).

[0027] In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor PS-519 (ein β -Lacton-Derivat) eine starke anti-inflammatorische Wirkung ausübt, und zwar in beiden, der verzögerten als auch der über-sensitiven Entzündungsreaktion. In niedrigen Dosen ist PS-519 auch wirksam in Kombination mit Steroiden. PS-519 wurde daher als ein neues Medikament für die Asthma-Behandlung vorgeschlagen (Elliot et al., 1999). Eine weitere Anwendung für PS-519 ergibt sich im Infarkt-Modell: Die inflammatorische Reaktion nach cerebralen Verletzungen wurde durch PS-519 dramatisch reduziert. Danach scheint PS-519 ebenfalls ein interessantes Pharmakon für die Behandlung von Gehirnschlag zu sein (Phillips et al., 2000).

[0028] Da Proteasom-Inhibitoren einen essentiellen Pathway im Zellmetabolismus treffen, ist ein strenges Dosis-Regime notwendig, um toxische Neben-Effekte zu unterdrücken. Im Rahmen der Entwicklung von in vivo verträglichen Proteasom-Inhibitoren wurden verschiedene Peptid-Borsäure-Derivate getestet, welche sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell Anti-Tumorwirkung zeigten (Adams et al., 1996; 1998; 1999). In vitro besitzt PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen Tumorzelllinien (Adams et al., 1999). Diese Aktivität ist mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden (Adams et al., 1999). Direkte Injektion von PS-341 bewirkte das Absterben von 70% der untersuchten Tumoren im Maus-Modell. Nach intravenöser Verabreichung von PS-341 verteilte sich die Substanz in allen Organen und Geweben und hatte anti-neoplastische Aktivität in human-Xenograft-Modellen (Adams et al., 1999).

[0029] Toxikologische Studien zu PS-341 in Primaten erbrachten Dosis-abhängige Nebenwirkungen vor allem im gastrointestinalen Bereich, wo PS-341 die höchste Verteilung nach intravenöser Applikation zeigte (Adams et al., 1999). Ein weiterer wesentlicher Nachteil von PS-341 ist, dass diese Substanz und verwandte Inhibitoren nicht die Blut-Hirnschranke überwinden und somit nicht im Zentralnervensystem wirksam werden kann (Adams et al., 1999).

Dies ist ein wesentlicher Nachteil für die vollständige Behandlung aller Zellen eines Organismus, insbesondere der Entfernung des neuronalen Virus-Reservoir im Falle einer HIV-Infektion.

[0030] Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren mit dem Ziel, virale Infektionen zu blockieren, wurde bereits beschrieben. Insbesondere wurde von Schubert et al. (2000) gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Assemblierung, Freisetzung und proteolytische Reifung von HIV-1 und HIV-2 blockieren. Dieser Effekt beruht auf einer spezifischen Blockade der proteolytischen Prozessierung der Gag-Polypeptide durch die HIV-Protease, ohne dass Proteasom-Inhibitoren die enzymatische Aktivität der viralen Protease selbst beeinflussen. Der Mechanismus, mit welchem Proteasomen die Assemblierung verschiedener Viren regulieren, ist bislang unverständlich. Weitere Zusammenhänge mit dem UPS wurden für Budding von Rous-Sarcoma-Virus, RSV (Patnaik et al., 2000); Simian Immunodeficiency Virus, SIV (Strack et al., 2000), und Ebola-Virus (Harty et al., 2000) berichtet. Im letzteren Fall (Harty et al., 2000) wurde gezeigt, dass eine zelluläre Ubiquitinligase mit Ebola-Matrixprotein in Wechselwirkung tritt, eine direkte Bedeutung der Proteasom-Aktivität für die Replikation von Ebola oder verwandten Viren sowie die Inhibierung der Assemblierung Ebola-Viren wurde bislang nicht gezeigt.

Filoviren als Erreger von viralem hämorrhagischen Fieber

[0031] Ebola-Viren als Vertreter der Familie der Filoviridae (umhüllte, nicht segmentierte negativ-Strang RNA-Viren) verursachen akute, häufig tödlich verlaufende "virale hämorrhagische Fieber" (VHF) in Menschen und non-humanen Primaten (Affen). Für die Therapie und Vorbeugung einer VHF-Erkrankung existieren zur Zeit keinerlei Vaccine oder effektive Behandlungsmöglichkeiten (für Review siehe Wilson et al., 2001). Obgleich es keine ausreichenden biologischen Erklärungen für die extreme Virulenz dieser Viren gibt, deuten Untersuchungen an Ebola-Viren darauf hin, dass Hüllproteine sowie die Wechselwirkung von viralen Proteinen mit dem Immunsystem möglicherweise eine wichtige Rolle für die außergewöhnliche Pathogenität dieser Viren spielen (für Review siehe Takada und Kawaoka, 2001).

[0032] Neben dem Ebola- ist das Marburg-Virus die zweite zur Familie der Filoviridae gehörende Spezies. Beide Spezies, Ebola und Marburg, sind serologisch, biochemisch und genetisch verschieden. Das Marburg-Virus wurde erstmals bei einem Ausbruch in Marburg/Deutschland 1967 isoliert. Das Ebola-Virus wurde zuerst 1976 als Verursacher von zwei gleichzeitig auftretenden Epidemien im südlichen Sudan und in Nord-Zaire identifiziert (für Review siehe Beer et al., 1999). Bisher wurden insgesamt 23 Marburg- und Ebola-Virus-Ausbrüche bei Mensch und Affen registriert. Die meisten der 1,100 registrierten Erkrankungen in

Menschen, mit ca. 800 Todesfällen, traten in Afrika auf (für Review siehe Schou und Hansen, 2000). Die Verbreitung der durch diese Viren hervorgerufenen VHF erfolgt hauptsächlich über direkten Personenkontakt. Trotz intensiver Untersuchungen und der Tatsache, dass einige der Ausbrüche mit Kontakten zu Affen in Verbindung gebracht werden konnten, ist das natürliche Reservoir für Filoviren noch unbekannt (für Review siehe Schou und Hansen, 2000).

[0033] VHF sind schwere oft lebensbedrohliche Erkrankungen, die durch verschiedene Viren hervorgerufen werden können. Allerdings sind unter den VHF hervorrufenden Viren zur Zeit nur vier bekannt, die durch direkten Personenkontakt übertragen werden (für Review siehe Armignacco et al., 2001): Lassa virus, Krim/Kongo hämorrhagisches Fieber Virus, Ebola-Virus und Marburg-Virus. VHF-Erkrankungen sind nur in wenigen Gebieten endemisch, darunter hauptsächlich Afrika und ländliche Gebiete des Mittleren Ostens und Osteuropas (für Review siehe Armignacco et al., 2001). Allerdings erhöht sich auch das Risiko für ein Auftreten von VHF Erkrankungen in nicht-endemischen Länder. Ursachen hierfür sind die zunehmende Zahl von internationalen Reisen, der Handel und die Verbreitung von Affen, und nicht zuletzt auch die Möglichkeiten einer absichtlichen Verbreitung im Sinne von bioterroristischen Aktionen.

[0034] Bezüglich der Rolle des UPS in der Replikation von VHF-Erregern wurde berichtet, dass ein Ub-Ligase ähnliches zelluläres Protein Tsg101 bei der Assemblierung und Freisetzung von Ebola-Virus-ähnlichen Partikeln eine Rolle spielt und dass kurze Peptide aus der Assemblierungsdomäne von Ebola-Matrixprotein EbVp40 die Virusassemblierungsfunktion der L-Domäne von HIV-1 p6gag komplementieren kann (Martin-Serrano et al., 2001). Der Mechanismus dieser Wirkung von Ebola-Proteinen im Zusammenhang mit der Funktion des UPS sowie speziell die Funktion von Tsg101 bei der Assemblierung und Freisetzung von Ebola-Viren ist bisher nicht verstanden. Ebenfalls wurde bislang nicht untersucht, ob Inhibitoren des UPS die Replikation von Ebola oder verwandten Erregern des viralen hämorrhagischen Fiebers hemmen.

[0035] Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass bei allen bisherigen Verwendungen von Proteasom-Inhibitoren keine selektiv für spezifische Körperzellen wirksame Verfahren eingesetzt wurden. Diese Inhibitoren werden unspezifisch von allen Zellen aufgenommen und blockieren daher in allen erreichbaren Zellen und Organen das UPS gleichermaßen. Bislang wurde die Wirkung von den in dieser Erfindung beschriebenen aktivierbaren Proteasom-Inhibitoren noch nicht getestet, vor allem solche, bei denen durch Proteolyse mittels einer für die Targetzelle spezifische Protease die wirksame Komponente eines Proteasom-Inhibitors aus einem Pro-Drug freigesetzt wird. Solche aktivierbaren Proteasom-Inhibitoren, zum Beispiel solche, die als "Pro-

Drug" von Zellen aufgenommen und dann durch zellspezifische Faktoren aktiviert werden, wurden bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben. Ebenfalls wurde bislang nicht die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die bevorzugte Induktion von Apoptose in HIV-infizierten Zellen erörtert. Weiterhin wurde bisher nicht getestet, ob Proteasom-Inhibitoren die Assemblierung und Freisetzung von Ebola oder verwandten Erregern von viralem hämorrhagischen Fieber blockieren.

Zelltransduktion durch trojanische Peptide als "Drug-Delivery-System"

[0036] Die Bioverfügbarkeit von niedermolekularen Pharmaka erfordert, dass diese Substanzen zum einen polar genug sind für die Verabreichung in wässrigen Lösungen und gleichzeitig hydrophob genug sind für die passive Diffusion durch Membranen zum Zweck der Zellaufnahme. Verschiedene Methoden zur Verbesserung der Zellaufnahme wurden bisher beschrieben, zum Beispiel die Modifizierung mit Lipiden oder der Einbau in Liposomen.

[0037] Neuere Studien zeigen, dass natürlich vorkommende Makromoleküle wie zum Beispiel die regulatorischen HIV-1 Proteine Tat (Frankel und Pabo, 1988) und Vpr (Henklein *et al.*, 2000) die Zellmembran in einem Rezeptor-unabhängigen Pathway penetrieren. Dieser Prozess erfolgt selbst bei niedrigen Temperaturen, ist nicht saturierbar und wird als Protein-Transduktion bezeichnet (für Review siehe Lindgren *et al.*, 2000). Bestimmte Sequenzen, vor allem basischen Sequenzen dieser auch als "trojanische Proteine" bezeichneten Faktoren, lösen diese Zellmembran-transduzierende Aktivitäten aus. Hierzu zählen zum Beispiel die Sequenz RKKRRQRRR von Tat⁴⁹⁻⁵⁷ (Nagahara *et al.*, 1998) oder eine 12 Aminosäuren lange Sequenz von Tat⁴⁸⁻⁶⁰ (Futaki *et al.*, 2001) sowie andere kurze Sequenzen von Antennapedia, Fibroblasten Wachstumsfaktor oder Herpes Simplex Virus-1 Strukturprotein VP22 (für Review siehe Derossi *et al.*, 1998). Weitere transduzierende Domänen wurden in einer Studie von Futaki *et al.* (2001) verglichen, dazu gehören RNA-bindende Virus-Proteine wie zum Beispiel HIV-1 Rev, Flock Haus Virus coat Protein, ebenso DNA-bindende Segmente von Leuzin Zipper-Proteinen wie zum Beispiel c-Fox und c-Jun, sowie der Transkriptionsfaktor GCN4. Alle diese transduzierenden Domänen haben vermutlich kein gemeinsames Sekundär-Strukturmotiv, jedoch scheint das Vorhandensein von basischen Ladungen für die Zelltransduktion essentiell (Futaki *et al.*, 2001). Diese Strukturen haben ein großes Potential als Drug-Delivery-System.

[0038] Die Verwendung von trojanischen Peptiden zum Zweck der Protein-Transduktion von Pro-Drugs wurde bislang nicht beschrieben. Ebenfalls ist nicht bekannt, dass Proteasom-Inhibitoren aus Pro-Drugs durch zelluläre oder virale (zum Beispiel HIV) Proteasen freigesetzt

und aktiviert werden können. Die Fusion von trojanischen Peptiden mit Proteasom-Inhibitoren wurde ebenfalls noch nicht beschrieben.

HIV-Infektion und Apoptose

5 [0039] Es ist ebenfalls bekannt, dass HIV-Infektionen die Apoptose, das heißt den programmierten Zelltod einer infizierten Zelle, beschleunigen. Die pathophysiologische Rolle der Apoptose, zum Beispiel in der Störung der Hämostase, wurde bereits ausführlich erforscht (für Review siehe Thompson, 1995). Die verstärkte Apoptose, spontan oder induziert durch Aktivierung, zum Beispiel des Fas-Rezeptors, wurde in Lymphozyten von HIV-Infizierten
10 berichtet. Die Apoptose in T-Zellen kann zum Beispiel durch Signalisierung von Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor ausgelöst werden. Weiterhin ist bekannt, dass $CD4^+$ wie auch $CD8^+$ T-Zellen im peripheren Blut HIV-1-Infizierten einen relativ hohen Level an Apoptose-Rezeptor wie auch Fas-Liganden exprimieren. In diesem Zusammenhang wurde auch beschrieben, dass die relative Zahl apoptotischer Zellen sowie die Expression von Fas-Rezeptor
15 während der anti-retroviralen Behandlung mit HIV-Protease-Inhibitoren in HIV-Infizierten zurückgeht (für Review siehe Flexner, 1998). Alle bisherigen anti-retroviralen Therapieansätze streben die Verhinderung der Apoptose im HIV-infizierten Organismus an; über die Induktion und Verstärkung der Apoptose in bereits infizierten Zellen mit dem Ziel der möglichst raschen Eliminierung dieser Zellen wurde bisher nicht berichtet. Bislang gibt es ebenfalls keine
20 Informationen in der Fach- und in der Patent-Literatur über die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Apoptose in HIV-infizierten Zellen.

Die HIV-Protease

[0040] Drei HIV-kodierte Enzyme sind wesentlich am Replikationszyklus des Virus beteiligt:
25 Die Integrase (für Integration des pro-virale DNA-Genoms), die RNA-abhängige DNA-Polymerase, auch bezeichnet als Reverse Transkriptase (für Umschreibung der RNA in ein DNA-Genom) sowie die virale Protease (für Prozessierung der viralen Gag und Gag-Pol-Polypoteine). Die als Prozessierung oder auch Reifung bezeichnete proteolytische Spaltung der Polypoteine resultiert in der Formierung reifer Strukturproteine des Viruscores, einzelner funktioneller
30 Proteine wie zum Beispiel dem Nukleokapsid $p7^{NC}$ oder den $p6^{gag}$ -Proteinen sowie den viralen Enzymen einschließlich der Protease selber, welche autokatalytisch aus dem Gag-Pol-Polypotein herausgespalten wird (für Review siehe Erickson und Eissenstat, 1999). Die Expression des Gag-Pol-Polypoteins $p180^{gag-pol}$ selbst erfolgt durch ribosomalen frameshift im Bereich des C-Terminus von $p7^{NC}$ während der Translation von Pr55-Polypotein. Dies ist ein relativ seltenes

Ereignis, ca. 5% der Translation von Pr55-Molekülen erfolgt als Gag-Pol-Polypolypeptid. Der initiale Schritt in der Reifung des Gag-Pol-Polypeptids ist die Dimerisierung und Faltung im Bereich der Protease-Domäne, notwendig für die autokatalytische Freisetzung der Protease. Dieser Mechanismus garantiert die Aktivierung der HIV-Protease nur im Prozess der
5 Assemblierung, Budding und Reifung von nascenten Viruspartikeln.

[0041] Die HIV-Protease als ein hauptsächliches Target für anti-retrovirale Pharmakaentwicklung wurde kloniert, in pro- und eukaryotischen Organismen in rekombinanter Form dargestellt, die molekulare Struktur und die Wirkmechanismen wurden intensiv erforscht und aufgeklärt. Basierend auf diesem Wissen wurden zahlreiche Inhibitoren der HIV-Protease
10 entwickelt und erfolgreich in der Behandlung von HIV-Infektionen eingesetzt (für Review siehe Erickson und Eissenstat, 1999). Einige dieser Verbindungen stellen die momentan wirksamsten Pharmaka für die Blockierung der HIV-Replikation *in vivo* dar. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass aufgrund der hohen Mutationsrate von HIV die kontinuierliche Applikation von Protease-Inhibitoren zu Selektion von resistenten Viren führen kann (Condra *et al.*, 1995).

15 [0042] Retrovirale Proteasen besitzen ca. 99 bis 125 Aminosäuren und bilden generell symmetrische Homodimere. Die HIV-Protease ist eine Aspartat-Protease, welche als Dimer wirksam wird. Die HIV-Protease spaltet an mindestens 9 unterschiedlichen Spaltstellen in den viralen Poly-Proteinen Pr55^{gag} und P180^{gag-pol} (für Review siehe Tomasselli und Heinrichson, 1994, sowie Figur 1). Dabei interagiert die Protease mit 8 Aminosäurepositionen, bezeichnet als
20 P4 bis P4', jeweils in der N- und C-terminalen Umgebung der Spaltstelle (Fig. 1). Die am meisten konservierte Aminosäure ist Glutamat in Position P2'. Unter Verwendung von "phage display libraries" wurde eine optimale Erkennungssequenz für die HIV-Protease ermittelt, GSGIF*LETSL, die beispielsweise 60 Mal effizienter als natürliche HIV-Gag-Substrate gespalten wird (Beck *et al.*, 2000). Die Spaltstellen für die HIV-Protease in HIV-Polypeptiden
25 werden ausschließlich nur durch die HIV-Protease erkannt, eine Komplementation der Funktion der viralen Protease durch zelluläre Proteasen wurde bislang nicht beobachtet.

[0043] Die Methode der spezifischen Aktivierung eines Pro-Drug durch die HIV-Protease wurde bereits für eine Variante des Diphtherie-Toxins beschrieben (Falnes, 2000). Als das zugrunde liegende Prinzip wird ein allgemein instabiles Diphtherie-Toxin durch HIV-Protease-Spaltung in
30 eine metabolisch stabile Variante überführt (Falnes *et al.*, 1999). Diphtherie-Toxine blockieren allgemein die Proteinbiosynthese und führen dadurch zum Zelltod. Obwohl das Wirkprinzip dieses Verfahrens *in vitro* gezeigt wurde, konnte eine Aktivierung des Pro-Drugs sowie eine anti-virale Wirkung in HIV-infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Als Ursache geben die Autoren die zu geringe Konzentration von HIV-Protease im Zytosol an.

[0044] Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass bisher keine Therapie-Konzepte in der wissenschaftlichen wie auch in der Patentliteratur beschrieben wurden, die auf der Wirkung der HIV-Protease beruhen, außer der Inhibierung der Aktivität der HIV-Protease selbst in Form von PR-Inhibitoren. Ebenso wurde bislang noch nicht beschrieben, dass die HIV-Protease verwendet
5 wird, um ein Pro-Drug nach unspezifischer Zellaufnahme intrazellulär in der Zielzelle zu aktivieren.

[0045] In der Veröffentlichung Schubert *et al.*, 2000 ist am Beispiel von HIV-1 und HIV-2 gezeigt worden, dass Proteasom-Inhibitoren sowohl die Prozessierung der Gag-Proteine als auch die Freisetzung von Viruspartikeln sowie die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel und
10 somit die Virusreplikation in Zellkultur blockieren. Die bislang eingesetzten Proteasom-Inhibitoren sind niedermolekulare, in der Regel kleine Di- oder Tri-Peptid-Derivate, welche Membran-permeable sind, daher von verschiedenen Zellen im Organismus aufgenommen werden können und dort intrazellulär spezifisch an das 26S Proteasom-Partikel binden und entweder alle oder selektiv einige seiner proteolytischen Aktivitäten inhibieren. Wesentlicher
15 Nachteil der Anwendung dieser "klassischen" Proteasom-Inhibitoren ist deren Toxizität. Sie beruht auf der allgemein bekannten Tatsache, dass das UPS an einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt ist und dadurch für die Aufrechterhaltung der Zellphysiologie vitale Funktionen ausübt. Die vollständige Inhibierung der essentiellen Proteasom-Funktion ist daher mit dem Leben einer Zelle auf Dauer nicht vereinbar.

20

Das Wesen der Erfindung

[0046] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Nachteile der bekannten Inhibitoren zu beseitigen. Die Aufgabe wurde durch aktivierbare, sogenannte Trojanische Inhibitoren (TI) gelöst, d.h. durch Inhibitoren, die zunächst inaktiv sind und erst in der Zielzelle durch eine für die
25 Zielzelle spezifische Protease aktiviert werden. Erfindungsgemäß werden dazu Trojanische Proteasom-Inhibitoren (TPI) und/oder Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) eingesetzt.

[0047] Die Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) bestehen aus einem Fusionat von Proteasom-Inhibitoren und trojanischen Peptiden. Diese neuartigen Proteasom-Inhibitoren werden als inaktive Pro-Drugs in Zellen aufgenommen. Die Trojanischen Assemblierungs-
30 Inhibitoren (TAI) bestehen aus einem Fusionat von zwei aktiven Komponenten, aus Assemblierungs-Inhibitoren und aus trojanischen Peptiden.

[0048] Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, die erfindungsgemäßen Trojanischen Inhibitoren (TI) als Therapeutika zu verwenden. So besteht ein Ziel darin, sie so einzusetzen, dass sich Mittel entwickeln lassen, mit denen virale Infektionen behandelt werden können.

[0049] Dies betrifft insbesondere Infektionen, bei denen in der infizierten Wirtszelle eine Virus-spezifische Protease exprimiert wird. Das trifft für die Behandlung von HIV-Infektionen, insbesondere für die AIDS-Therapie zu.

[0050] Ein weiteres Ziel besteht darin, sie so einzusetzen, dass sich Mittel entwickeln lassen, mit denen virale hämorrhagische Fieber bekämpft werden können. Die Aufgabe wurde mit Hilfe von pharmazeutischen Zubereitungen gelöst, die zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von von Lentiviren sowie von Filoviren (Familie der Filoviridae) geeignet sind. Diese Zubereitungen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponente mindestens einen Proteasom-Inhibitor und / oder mindestens einen Trojanischen Proteasom-Inhibitor und / oder mindestens einen Trojanischen Assemblierungs-Inhibitor enthalten. Diese Aufgabe wurde also durch eine Kombination von Proteasom-Inhibitoren einerseits und Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) bzw. Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren andererseits gelöst.

[0051] Da die vollständige Inhibierung der essentiellen Proteasom-Funktion mit dem Leben einer Zelle auf Dauer nicht vereinbar ist, sind herkömmliche Substanzen von Proteasom-Inhibitoren ähnlich anderer zytotoxischer oder zytostatisch wirkender Chemotherapeutika nur unter einem strengen Dosis-Regime klinisch einsetzbar. Dies bedeutet, dass bei einer klinischen Anwendung solcher Inhibitoren ein enger Bereich zwischen dem gewünschten therapeutischen Effekt und der toxischen Nebenwirkung eingehalten werden muss, dem sogenannten "therapeutischen Fenster". Bei jeglicher therapeutischen Anwendung von klassischen (bereits bekannten oder beschriebenen) Proteasom-Inhibitoren muss also ein Kompromiss zwischen dem beabsichtigten therapeutischen Effekt und den toxischen Nebenwirkungen kalkuliert werden. Eine totale Inhibierung des UPS in allen Zellen, Geweben und Organen für einen längeren Zeitraum ist für eine klinische Anwendung faktisch nicht möglich. Die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren kann damit nur lokal und zeitlich beschränkt erfolgen. Ihre therapeutische Wirksamkeit ist dadurch beschränkt. Zahlreiche toxische Nebenwirkungen wurden bei Hoch-Dosis-Applikation von Proteasom-Inhibitoren in klinischen Studien beobachtet.

[0052] Überraschenderweise ist es gelungen, die Toxizität der Proteasom-Inhibitoren dadurch zu verhindern, dass die wirksame Komponente des Proteasom-Inhibitors nur in den gewünschten Target-Zellen aus dem Pro-Drug durch zell-spezifische Faktoren freigesetzt werden und dann nur in den gewünschten Zielzellen das UPS blockieren.

[0053] Erfindungsgemäß können dadurch therapeutische Effekte in gewünschten Ziellzellen ausgelöst werden, ohne dabei die Proteasom-Aktivität in anderen, gesunden Zellen des Organismus zu beeinflussen. Dadurch haben die erfindungsgemäßen Inhibitoren (TPI) keine

toxischen Nebenwirkungen auf andere Zellen des Organismus und können daher in hohen therapeutisch wirksamen Dosen *in vivo* eingesetzt werden.

[0054] Konkret kann mit TI, PI TPI und / oder TAI die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen unterdrückt und der Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöht werden.

[0055] Gemäß einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung können speziell in HIV-infizierten Zellen anti-retrovirale Wirkungen ausgelöst werden. Diese betreffen die Induktion der Apoptose in HIV-infizierten Zellen und damit das bevorzugte Absterben von HIV-infizierten Zellen im Organismus. Gleichzeitig werden durch Inhibierung der Assemblierung und Reifung von Virionen die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Viruspartikeln gestört. In der Gesamtsumme dieser Wirkung kann eine therapeutische Wirkung durch Blockade der Virusreplikation und Entfernung HIV-produzierender Zellen im Organismus bewirkt werden.

[0056] Gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung können speziell in Filoviren-infizierten Zellen antivirale Wirkungen ausgelöst werden. Gleichzeitig werden durch Inhibierung der Assemblierung und Reifung von Virionen die Freisetzung und die Produktion von infektiösen Viruspartikeln gestört. In der Gesamtsumme dieser Wirkung kann eine therapeutische Wirkung durch Blockade der Virusreplikation und Entfernung Filoviren-produzierender Zellen im Organismus bewirkt werden.

[0057] Mit den erfindungsgemäßen Trojanischen Inhibitoren (TI) wird eine neue Klasse von Inhibitoren bereitgestellt. Diese Inhibitoren werden als biologisch inertes Vorläufer-Medikament oder auch "Pro-Drug" durch die gezielte Verwendung der Wirkung eines bestimmten Zellmembran-transduzierenden Mechanismus von allen Zellen des Organismus aufgenommen. Nur in den gewünschten Zielzellen, zum Beispiel den Virus-infizierten Zellen, wird durch eine spezifische Protease die wirksame Komponente, und zwar die des Inhibitors, proteolytisch freigesetzt, die jetzt in der Zielzelle das UPS vollständig und irreversibel blockiert.

[0058] Dieses neuartige Prinzip hat verschiedene Vorteile:

- 1) eine dauerhafte und irreversible Inhibierung des Proteasoms ist selektiv in der Zielzelle möglich
- 2) eine hohe und zeitlich unlimitierte Dosierung solcher neuartigen Pharmaka ist möglich
- 3) eine spezifische Beeinflussung von ausschließlich nur der Targetzelle, zum Beispiel von HIV-infizierten oder von Filoviren-infizierten Zellen, ist möglich

- 4) unspezifische und toxische Nebenreaktionen sind reduziert, da uninfizierte und gesunde Zellen im Organismus nicht getroffen werden.

[0059] Zum Beispiel sind im Fall einer HIV-Infektion nur die Wirtszellen für HIV, welche hauptsächlich die peripheren CD4⁺T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen darstellen, von dem TPI-Prinzip betroffen. Da nur die HIV-infizierten Zellen auf das neuartige Wirkprinzip ansprechen, werden die toxischen Nebenwirkungen mit dieser neuen Art von aktivierbaren Proteasom-Inhibitoren wesentlich reduziert oder gänzlich ausgeschaltet, insbesondere im Unterschied zu den klassischen Proteasom-Inhibitoren, die unspezifisch den Proteasom-Pathway aller Körperzellen blockieren und dadurch beträchtliche Nebenwirkungen auslösen können.

10 [0060] Ein weiterer wesentlicher Bestandteil und überraschender Effekt dieser Entwicklung ist die Beobachtung, dass die Blockade des UPS bevorzugt das Absterben (die Apoptose) von infizierten Zellen induziert. Als therapeutisches Prinzip der induzierbaren Proteasom-Inhibitoren kann die vollständige und dauerhafte Blockade des Proteasoms selektiv in infizierten Zellen induziert werden. Die antivirale Wirkung hat dabei zwei Komponenten:

- 15 1. das Absterben der infizierten Zelle, und
 2. werden in dem Zeitraum des Wirksamwerdens der aktiven Proteasom-Inhibitoren nur noch unreife und damit nicht infektiöse Viruspartikel produziert.

[0061] In der Summe unterbindet diese Wirkung die Ausbreitung der Infektion im Organismus, das heißt, die Neuinfektion von Körperzellen und reduziert gleichzeitig die Zahl der infizierten Zellen im Organismus.

[0062] Die erfindungsgemäßen Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) sind dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahme in die gewünschte Zielzelle unter Verwendung Zellmembran-transduzierender Eigenschaften mit Hilfe trojanischer Peptide erfolgt und die Aktivierung des Pro-Drugs durch Proteolyse mittels spezifischer Protease – einer viralen Protease – erfolgt, welche die beiden aktiven Komponenten miteinander verbindet.

[0063] Diese Trojanischen Proteasom-Inhibitoren bestehen aus einer transduzierenden Domäne, einer Linker-Domäne, einer Protease-Spaltstelle und einer Effektor-Domäne, wobei

- die transduzierende Domäne aus einer 8 bis 15 Aminosäuren langen Sequenz besteht, welche die Fähigkeit zur Zelltransduktion besitzt und
- 30 - die Linker-Domäne aus einer 3 bis 6 Aminosäuren langen Poly-Glycin-Sequenz besteht, welche die transduzierende Domäne mit der Spaltstelle für die virale Protease verbindet.
- Die Protease-Spaltstelle besteht aus einer 6 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz, die eine optimierte Erkennungssequenz für

- virale Proteasen, die im Prozess des viralen Replikationszyklus durch virale Genexpression in der infizierten Zelle gebildet werden und virale Polypeptide spalten, wozu virale Proteasen aus der Familie der
 - a. *Retroviridae*, wie zum Beispiel Human immunodeficiency virus 1 und 2, Simian immunodeficiency virus, Equine infectious anemia virus (alle Genus Lentivirus), Human T-lymphotropic virus 1 und 2 (Genus Deltaretrovirus), Mason-Pfizer monkey virus (Genus Betaretrovirus), Murine leukemia virus (Genus Gammaretrovirus)
 - b. *Picornaviridae*, wie zum Beispiel Poliovirus, Coxsackievirus (alle Genus Enterovirus), Human rhinovirus A (Genus Rhinovirus), Hepatitis-A-Virus (Genus Hepatovirus)
 - 10 c. *Flaviviridae*, wie zum Beispiel Tick-borne encephalitis virus, Dengue virus, Yellow fever virus (alle Genus Flavivirus), Hepatitis-C-Virus (Genus Hepacivirus)
 - d. *Adenoviridae*, wie zum Beispiel Human adenovirus C (Genus Mastadenovirus)
 - e. *Asfarviridae*, wie zum Beispiel African swine fever virus (Genus Asfivirus)
 - f. *Herpesviridae*, wie zum Beispiel Human cytomegalovirus (Betaherpesvirinae),
15 Pseudorabies virus (Alphaherpesvirinae)
 - g. *Birnaviridae*, wie zum Beispiel Infectious bursal disease virus (Genus Avibirnavirus), Infectious pancreatic necrosis virus (Genus Aquabirnavirus)
 - h. *Arteriviridae*, wie zum Beispiel Equine arteritis virus (Gattung Arterivirus)
 - i. *Coronaviridae*, wie zum Beispiel Avian coronavirus infectious bronchitis virus, Mouse
20 hepatitis virus (alle Genus Coronavirus) oder
 - j. *Togaviridae* wie zum Beispiel Sinbis virus (Genus Alphavirus)
 - k. *Filoviridae* wie zum Beispiel Marburg- oder Ebola-Virus, Lassa- oder Krim/Kongo-Virus gehören oder für
 - zelluläre Proteasen, welche spezifisch in einer Krebszelle exprimiert werden oder wo die
25 Expression und/oder die Aktivität in Krebszellen höher ist als in gesunden Zellen oder für
 - tumor-spezifische Proteasen
- enthält.

[0064] Die Zuordnung der Virusproteasen lässt sich folgendermaßen vornehmen:

Die erfindungsgemäßen Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) weisen Protease-Spaltstelle
30 aus einer 6 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz auf, die eine optimierte Erkennungssequenz für virale Proteasen, die im Prozess des viralen Replikationszyklus durch virale Genexpression in der infizierten Zelle gebildet werden und virale Polypeptide spalten, wozu virale Proteasen aus der Familie der

- *Retroviridae*, mit der Protease PR und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Human immunodeficiency virus Typ 1 und 2 (humane Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2), Simian immunodeficiency virus (Affen-Immundefizienzviren, SIV), Equine infectious anemia virus (alle Genus Lentivirus), Human T-lymphotropic virus Typ 1 und 2 (HTLV-1 und HTLV-2, Genus Deltaretrovirus), Mason-Pfizer monkey virus (Genus Betaretrovirus) oder Murine leukemia virus (Genus Gammaretrovirus)
- *Picornaviridae*, mit den Proteasen 2A und 3C sowie anderen viralen Proteasen in Viren, wie Poliovirus (Genus Enterovirus), Human rhinovirus A (Genus Rhinovirus) oder Hepatitis-A-Virus (Genus Hepatovirus)
- *Adenoviridae*, mit der Adenovirusproteinase und anderen Cystein-Proteasen in Viren, wie Human adenovirus C (Genus Mastadenovirus)
- *Asfarviridae*, mit African swine fever virus Protease und anderen viralen Cystein-Proteasen in Viren wie African swine fever virus (Genus Asfivirus)
- *Herpesviridae*, mit der HCMV (Humanes Cytomegalo-Virus)-Protease und anderen viralen Serin-Proteasen in Viren, wie Human cytomegalovirus (Betaherpesvirinae) oder Pseudorabies virus (Alphaherpesvirinae)
- *Birnaviridae*, mit der viralen VP4 Protease sowie anderen viralen Serin-Proteasen in Viren, wie Infectious bursal disease virus (Genus Avibirnavirus) oder Infectious pancreatic necrosis virus (Genus Aquabirnavirus)
- *Arteriviridae*, mit der Protease nsp4 und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Equine arteritis virus (Genus Arterivirus)
- *Coronaviridae*, mit den Proteasen "3C-ähnliche Protease", "Papain-ähnliche Cystein-Protease 1", der Virusprotease "PCP-1" und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Avian coronavirus infectious bronchitis virus oder Mouse hepatitis virus (alle Genus Coronavirus) sowie
- *Togaviridae*, mit der Protease "nsP2" und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Sinbis virus (Genus Alphavirus)
- *Flaviviridae*, mit Protease NS3 und anderen viralen Serin-Proteasen in Viren, wie Tick-borne encephalitis virus, Dengue virus, Yellow fever virus (alle Genus Flavivirus) oder Hepatitis-C-Virus (Genus Hepacivirus) sowie aus Familie der
- *Erreger des hämorrhagischen Fiebers (Filoviridae)* mit viralen Proteasen des Lassa-, Marburg-, Ebola-, oder Krim/Kongo-Virus gehören.

[0065] Die erfindungsgemäßen Trojanischen Proteasom-Inhibitoren sind ferner dadurch charakterisiert, dass die Effektor-Domäne

- aus einer 2 bis 5 Aminosäuren langen Sequenz oder aus anderen Aminosäure-ähnlichen Molekülen besteht, die nach proteolytischer Freisetzung durch die virale Protease das eigentliche Effektor-Molekül, den Proteasom-Inhibitor, bilden, welcher eine oder alle enzymatischen Aktivitäten des 26S Proteasom-Partikels in der Targetzelle blockiert
- Modifizierungen der C-terminalen COOH-Gruppe enthält, welche die katalytische Threonin1-Seitenkette der β -Untereinheit (lokalisiert im 20S katalytisch aktiven Core-Partikel im 26S Proteasom) entweder reversibel oder irreversibel blockieren, wobei es sich bei den Modifizierungen der C-terminalen COOH-Gruppe um
 - a. Borsäure-Strukturen oder
 - b. Aldehyd-Strukturen oder
 - c. Epoxyketon-Strukturenoder andere chemische Modifizierungen handelt, welche spezifisch mit der katalytischen β -Untereinheit des Proteasoms in Wechselwirkung treten
- eine freie Amino-Gruppe am N-Terminus enthält, wobei die N-terminalen Aminosäurepositionen in ihren Seitenketten Modifizierungen enthalten, welche die Interaktion mit dem Proteasom erleichtert, vorzugsweise N-carbobenzoxyl oder N-Pyrazincarbonyl.

20

[0066] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer neuen Klasse von Inhibitoren besteht darin, dass inaktive Vorläufer-Moleküle hergestellt werden, die erst in der gewünschten Ziel-Zelle, zum Beispiel im Falle einer HIV-infizierten Zelle, spezifisch als Inhibitor aktiviert werden. Die aktivierbaren Proteasom-Inhibitor-Vorläufer z.B. werden als Trojanische Proteasom-Inhibitoren bezeichnet (TPI). Dieser Name stammt von der Aktivität "trojanischer Peptide", welche die unikale Fähigkeit besitzen, effizient Zellmembranen zu durchdringen (Proteintransduktion). Die erfindungsgemäß hergestellte neue Klasse an TPI-Substanzen werden von Zellen durch Ausnutzung eines unspezifischen Transduktionsmechanismus aufgenommen, sind jedoch biologisch inert, haben als Pro-Drug keine inhibitorische Aktivität gegenüber dem UPS oder anderen zellulären Mechanismen und lösen daher keine zytotoxischen Nebenwirkungen aus. Erst nach spezifischer Aktivierung der von der Zelle aufgenommenen TPI-Substanzen wird intrazellulär und nur in den gewünschten Ziel-Zellen durch Proteolyse eine Komponente freigesetzt, welche jetzt als Proteasom-Inhibitor (PI) nur in der Ziel-Zelle das 26S Proteasom blockiert (siehe hierzu Figur 1).

30

[0067] Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung Trojanischer Inhibitoren besteht des näheren darin, dass ein Proteasom- oder Assemblierungs-Inhibitor mit einem trojanischen Peptid fusioniert wird. Dazu wird im Verlauf der Peptidsynthese z.B. eine transduzierende Domäne mit einer Protease-Spaltstelle über eine synthetische Linker-Domäne verbunden und weiterhin eine Effektor-Domäne so hinzugefügt, dass diese nach proteolytischer Freisetzung durch eine spezifische Protease in der Zielzelle das eigentliche Effektor-Molekül freisetzt und dadurch den wirksamen Proteasom-Inhibitor bildet. Dabei erfolgt die proteolytische Freisetzung der Effektor-Domäne aus dem Pro-Drug (oder inaktives Vorläufermolekül) mittels Targetzell-spezifischer Protease, vorzugsweise mit viraler Protease. Diese Aktivierung erfolgt nach der Aufnahme des TPI in der Targetzelle, welche erfindungsgemäß durch die transduzierende Domäne realisiert wird.

[0068] Der intrazelluläre Aktivierungsmechanismus von TPI-Substanzen wird durch spezifische Proteasen ausgelöst, welche unikal für die jeweilige Targetzelle sind, in welcher die aktive PI-Komponente den Ubiquitin/Proteasom-Pathway blockieren soll. Erfindungsgemäß werden verschiedene zelluläre wie auch virale Proteasen für den TPI-Aktivierungsmechanismus in Betracht gezogen. Hierzu zählen zum Beispiel virale Proteasen, die von dem viralen Genom in der Virus-infizierten Target-Zelle exprimiert werden. Das Wirkprinzip der Erfindung wird am Beispiel der HIV-Protease in HIV-1-infizierten Zellen näher dargestellt. Damit betrifft die Erfindung ein neuartiges Verfahren zur Transduktion und Freisetzung von Proteasom-Inhibitoren in Zielzellen.

[0069] Erfindungsgemäß besteht die neue Inhibitoren-Klasse "Trojanische Proteasom-Inhibitoren (TPI)" aus vier wesentlichen Domänen

a) Die transduzierende Domäne (TD)

[0070] Sie umfasst eine ca. 10 Aminosäuren lange Sequenz, welche die Fähigkeit zur Zelltransduktion besitzt. Diese Domäne vermittelt den Transport des TPI-Vorläufermoleküls durch die Zellmembran. Die Verwendung von Zell-transduzierenden Sequenzen hat den wesentlichen Vorteil, dass erfindungsgemäß dadurch Peptide unterschiedlicher Kettenlänge mit hoher Effizienz und in einem Rezeptor- und Energie-unabhängigen Pathway in Zellen eingebracht werden können. Der passive Transport von ca. 20 Aminosäuren langen Peptiden (der minimalen Sequenzlänge der in Rahmen der Erfindungsbeschreibung verwendeten TPI-Substanzen) durch die Zellmembranen kann ohne Ausnutzung des Zelltransduktionseffektes nicht gewährleistet werden. Mit der Wahl der TD-Domäne wird erfindungsgemäß ein weiterer wesentlicher Vorteil geschaffen, und zwar der, dass durch die transduzierende Wirkung der TD-Domäne eine effiziente Aufnahme in Zellen und Gewebe und darüber hinaus der Transport durch

die Blut-Hirn-Schranke gewährleistet werden kann. Die bislang klinisch applizierten Proteasom-Inhibitoren, wie z.B. PS-341, haben den wesentlichen Nachteil, dass sie nicht die Blut-Hirnschranke passieren und neuronale Zellen nicht erreichen können.

[0071] Erfindungsgemäß wird mit der Wahl der Zelltransduktion eine weitere Problematik der Erfindungsbeschreibung gelöst: Im Falle einer HIV-infizierten Zelle erfordert die Aktivierung der TPI-Vorläufermoleküle die effiziente Erkennung und Spaltung durch die HIV-Protease. Dieses Enzym ist in HIV-infizierten Zellen hauptsächlich an der Zellmembran, jedoch in keinem anderen zellulären Kompartiment aktiv, insbesondere im Zytoplasma ist enzymatisch aktive HIV-Protease faktisch nicht vorhanden. Nur im Verlauf der Assemblierung von HIV-Gag-Strukturprotein an der Zellmembran wird mit Assoziierung der Gag (Pr55^{gag}) und der Gag-Pol (p180^{gag-pol})-Vorläuferproteine autokatalytisch an der Zellmembran die HIV-Protease freigesetzt. Dieser Umstand wird bei dem erfindungsgemäßen Einsatz der TPI-Substanzen ausgenutzt: Im Prozess des Zelleintritts, sozusagen während der Passage von TPI-Substanzen durch die Zellmembran, werden diese von der viralen Protease an der zytosolischen Seite der Plasmamembran erkannt, prozessiert und in die aktive Komponente des PI (Proteasom-Inhibitors) umgewandelt (siehe hierzu Figur 1). Die HIV-Protease wird generell nur an der Zellmembran durch autokatalytische Spaltung aus dem Gag-Pol-Precursor-Protein im Prozess der Virusassemblierung und der damit verbundenen Prozessierung der HIV-Strukturproteine gebildet. Dieser wesentliche Nachteil einer bereits beschriebenen Methode von Falnes *et al.* (1999, 2000) wird erfindungsgemäß in unserem Verfahren dadurch gelöst, indem das Pro-Drug durch Proteintransduktion im Prozess des Zelleintritts in das zellmembrannahe Kompartiment gebracht wird, in welchem die höchste Konzentration an aktiver HIV-Protease in einer HIV-infizierten Zelle vorkommt.

[0072] Während dieses Prozesses wird ein weiterer Umstand der Zelltransduktion erfindungsgemäß ausgenutzt. Es ist allgemein bekannt, dass im Verlauf der Zelltransduktion die zu transduzierenden Proteine zumindest teilweise entfaltet werden müssen, um den Transport der Aminosäurekette durch eine passive Membranpore zu gewährleisten. Der Transport von gefalteten globulären Proteinstrukturen durch die Zellmembran ist aufgrund der Größe solcher Proteine nicht möglich. Im Prozess des Transports durch die Zellmembran wird die Struktur des TPI -Moleküls aufgefaltet, und erfindungsgemäß wird dabei die Protease-Spaltstelle im TPI-Molekül maximal exponiert und bildet dadurch ein optimales Substrat für die Erkennung und Spaltung durch die virale Protease.

[0073] Zusammengefasst werden mit dem erfindungsgemäß gewählten Verfahren drei Probleme gelöst:

- a. der effiziente Transport der TI-Substanzen in Zellen,
- b. die Ko-Lokalisierung mit der viralen Protease an der Zellmembran und
- c. die Entfaltung und dadurch effiziente Prozessierung durch die HIV-Protease im Prozess der Transduktion.

5 [0074] Die Fusion von kurzen transduzierenden Domänen, wie zum Beispiel der Tat-Sequenz R9 (Nagahara *et al.*, 1999), an niedermolekulare Effektormoleküle führt zu TPI-Substanzen. Die im Rahmen der Erfindung beschriebenen TPI-Substanzen haben nicht den Nachteil der Toxizität und Aggregation. Erstaunlicherweise ist die transduzierende Wirkung von poly-Arg sehr viel effizienter als die Wirkung von kurzen Oligomeren bestehend aus Histidin, Lysin und Ornithin
10 (Wender *et al.*, 2000). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von kurzen transduzierenden Proteinsequenzen, wie zum Beispiel Tat⁴⁹⁻⁵⁷, ist die Tatsache, dass Gesamt-Tat oder Vpr nicht nur Zellmembranen transduzieren, sondern auch in den Zellkern lokalisieren und dort verschiedene für eine pharmakologische Anwendung ungewollte Effekte – wie zum Beispiel Zellzyklusarrest und/oder Apoptose – auslösen (Henklein *et al.*, 2000). Durch die Verwendung
15 von kurzen Sequenzen aus Gesamtproteinen mit transduzierender Aktivität, wie zum Beispiel aus HIV-1 Tat und Vpr, können die toxischen und für die Anwendung ungewollten Aktivitäten der Gesamt-Proteine vermieden werden.

[0075] Diese Eigenschaft der Zelltransduktion hat einen wesentlichen Vorteil für das effiziente Einbringen von Pro-Drug Proteasom-Inhibitoren in verschiedene Zellen und Gewebe und wird
20 erfindungsgemäß durch den Einsatz von transduzierenden Peptiden und/oder Peptid-Derivaten zu Nutze gemacht. Die Verwendung von künstlichen, nicht in der Natur vorkommenden Transduktionsdomänen, wie zum Beispiel poly-Arginin oder poly-Guanidin, hat neben der effizienten Zelltransduktion einen weiteren wesentlichen Vorteil, und zwar den, dass solche Sequenzen kaum oder gar nicht intra- oder extrazellulären Protease zugänglich sind und dadurch
25 eine höhere Stabilität als natürlich vorkommende transduzierende Proteine haben. Folgende Sequenzen kommen als transduzierende Domäne in Frage:

Teilsequenzen trojanischer Proteine:

1) HIV-1 Tat-verwandte Sequenzen:

30 HIV-1 Tat-(48-60):	GRKKRRQRRRPPQ
D-Tat	GRKKRRQRRRPPQ
R9-Tat	GRRRRRRRRRPPQ
SV40-NLS	PKKKRKV
Nucleoplasmin-NLS	KRPAAIKKAGQAKKKK

2) RNA-bindende Peptide:

	HIV-1 Rev-(34-50)	TRQARRNRRRRWRERQR
	FHV coat-(35-49)	RRRRNRTRRNRRRV
5	BMV Gag-(7-25)	KMTRAQRRAAARRNRWTAR
	HTLV-II Rex-(4-16)	TRRQRTRRARRNR
	CCMV Gag-(7-25)	KLTRAQRRAAARKNKRNTR
	P22 N-(14-30)	NAKTRRHERRRKLAIER
	γ N-(1-22)	MDAQTRRRERRAEKQAQWKAAN
10	ϕ 21 N-(12-29)	TAKTRYKARRAELIAERR
	Yeast PRP6-(129-144)	TRRNKRNRRIQEQLNRK
	Human U2AF-(142-153)	SQMTRQARRLYV

3) DNA-bindende Peptide:

15	Human cFos-(139-164)	KRRIRRERNKMAAAKSRNRRRELTDT
	Human cJun-(252-279)	RIKAERKRMNRRIAASKSRKRKLERIAR
	Yeast GCN4-(231-252)	KRARNTAAARRSRARKLQRMKQ

4) Künstliche Sequenzen:

20	R ₄	RRRR
	R ₆	RRRRRR
	R ₈	RRRRRRRR
	R ₁₀	RRRRRRRRRR
	R ₁₂	RRRRRRRRRRRR
25	R ₁₆	RRRRRRRRRRRRRRRR

b) Linker-Domäne (LD)

[0076] Die Linker-Domäne besteht aus einer ca. 3 bis 5 Aminosäuren langen Poly-Glycin-Sequenz, welche die TD-Sequenz mit der HIV-Spaltstelle verbindet. Erfindungsgemäß werden

30 durch den Einschub einer Gly-Linker-Sequenz mögliche Auswirkungen der TD-Sequenz auf die Struktur, Faltung und somit Erkennung der Protease-Stelle unterdrückt. Sekundärstruktureffekte der TD-Sequenz könnten die Substrateigenschaften für die HIV-Protease und damit die Aktivierbarkeit des Inhibitors negativ beeinflussen.

c) Protease-Spaltstelle (PS)

- [0077] Die Protease-Spaltstelle (PS) stellt eine weitere kritische Domäne in TPI-Substanzen dar. Erfindungsgemäß umfasst sie eine ca. 8 Aminosäuren lange Sequenz, die eine optimierte Erkennungssequenz für die jeweilige Protease enthält, welche die aktive Proteasom-Inhibitor-Komponente aus dem TPI-Molekül proteolytisch freisetzt. Für das Beispiel einer HIV-Protease ermöglicht es diese Domäne, dass in HIV-infizierten Zellen mit aktiver HIV-Replikation, vermittelt durch die spezifische Proteolyse der HIV-Protease, aus dem TPI-Vorläufer die als Proteasom-Inhibitor wirksame Komponente freigesetzt wird. Nur diese Zellen werden eine aktive HIV-Protease exprimieren und können daher aus TPI-Substanzen aktive Proteasom-Inhibitoren freisetzen. Die Spezifität der TPI-Wirkung hängt damit von der Spezifität der Protease-Spaltstelle für die betreffende Protease ab, am Beispiel HIV-infizierter Zellen ist es die Spezifität der HIV-Protease. Wesentlicher Vorteil des Verfahrens ist somit die außerordentliche Spezifität der HIV-Protease. Bislang sind keine zellulären Proteasen bekannt, welche die Erkennungstellen der HIV-Protease in den viralen Polyproteinen Gag und Gag-Pol erkennen. Dadurch kann die Aktivierung der TPI-Vorläufer nicht durch andere zelluläre Proteasen erfolgen. Somit wird erfindungsgemäß garantiert, dass nur in HIV-infizierten Zellen die Proteolyse von TPI-Substanzen und dadurch die Aktivierung von Protease-Inhibitoren erfolgen kann. Dadurch wird erfindungsgemäß ausschließlich nur in HIV-infizierten Zellen die Inhibierung von Proteasomen garantiert.
- 20 [0078] Bekannte HIV-Protease-Spaltstellen, die bei der Prozessierung der HIV-1 Gag-Proteine eine Rolle spielen, sind in Figur 2 dargestellt.

d) Effektor- oder Proteasom-Inhibitor (PI)-Domäne

- [0079] Diese Domäne umfasst eine kurze, ca. 2 bis 5 Aminosäuren lange Sequenz, die nach proteolytischer Freisetzung durch Spaltung in der PS-Domäne das eigentliche Effektor-Molekül bildet, welches als Proteasom-Inhibitor (PI) spezifisch das 26S Proteasom blockiert. Die Effektor-Domäne enthält verschiedene Modifizierungen der C-terminalen COOH-Gruppe, wie zum Beispiel Borsäure-, Aldehyd- oder Epoxyketon-Strukturen, die bekanntermaßen in der Lage sind, mit der katalytischen Threonin¹-Seitenkette der β -Untereinheit (lokalisiert im 20S katalytisch aktiven Core-Partikles im 26S Proteasom) in Wechselwirkung zu treten und diese entweder reversibel oder irreversibel zu blockieren. Aufgrund der Gesamtlänge des TPI-Vorläufermoleküls wird erfindungsgemäß garantiert, dass nur das kurze Effektor-Molekül nach Proteolyse als PI wirksam wird. Mit ca. 25 Aminosäuren Gesamt-Länge können TPI-Substanzen nicht mit der katalytischen Untereinheit des 26S Proteasoms in Wechselwirkung treten. Dadurch

wird die Zelltyp-spezifische Wirkung der erfindungsgemäß hergestellten neuartigen Klasse an Proteasom-Inhibitoren sicher gestellt. Erfindungsgemäß wird damit garantiert, dass nur die PI-Domäne, nicht jedoch die als Pro-Drug applizierte TPI-Substanz die Proteasom-Aktivität blockiert.

- 5 [0080] Alle bislang beschriebenen klassischen Proteasom-Inhibitoren auf der Basis von Peptid-Derivaten zeichnen sich durch verschiedene N-terminale chemische Modifizierungen aus, zum Beispiel N-Carbobenoxyl- oder Pyranozyl-Modifikationen. Diese stark hydrophoben, in der Regel heterozyklischen Modifizierungen haben in erster Linie die Funktion, die klassischen Proteasom-Inhibitoren durch die Zellmembran zu transportieren. Diese Funktion ist bei den
- 10 erfindungsgemäß hergestellten TPI-Substanzen nicht erforderlich, da der Zelleintritt von TPI-Molekülen durch Zelltransduktion realisiert wird. Damit ist die im Rahmen der Erfindung realisierte freie Amino-Gruppe am N-Terminus der aktivierten PI-Moleküle für die Inhibierung der Proteasom-Funktion nicht hinderlich. Eine weitere Funktion der N-terminalen heterozyklischen Domäne bei den klassischen Proteasom-Inhibitoren ist die der Spezifität für das
- 15 26S Proteasom. Zum Beispiel haben Inhibitoren, welche N-Acetyl-L-L-L-Aldehyd-Strukturen besitzen, keine ausschließliche Spezifität für das Proteasom, sondern inhibieren auch andere zelluläre Proteasen, zum Beispiel Caspasen, und lösen daher apoptotische Prozesse aus. Dieser Umstand wird erfindungsgemäß ebenfalls ausgenutzt, insofern als inhibitorische Nebeneffekte – neben der Inhibierung von Proteasomen – auf andere zelluläre Proteasen für die Wirkung der
- 20 TPI-Substanzen nicht hinderlich sind. Denn das Ziel der im Rahmen der Erfindung hergestellten TPI-Substanzen mit antiviraler Wirkung ist das Absterben einer HIV-infizierten Zelle. Gleichzeitig garantiert die Inhibierung des Proteasoms, dass keine infektiösen Viren von der absterbenden Zelle mehr freigesetzt werden können.

[0081] Weiterhin ist die Aktivierung von NF- κ B notwendig für die Aktivierung des proviralen

25 Genoms einer latent HIV-infizierten Zelle. NF- κ B ist essentiell für die Promotor-Aktivität der HIV LTR-Region. Somit bewirkt die Blockierung der NF- κ B Aktivität durch Proteasom-Inhibitoren eine anti-virale Wirkung. Diese erfolgt unabhängig und zusätzlich zu der bereits bekannten Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf Budding und Reifung von infektiösen Viren.

- 30 [0082] Als ein weiterer überraschender Effekt hat sich herausgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren und insbesondere die erfindungsgemäßen TPI bevorzugt Apoptose in infizierten Zellen induzieren. Es ist bereits bekannt, dass vielfältige Verbindungen zwischen dem UPS und der Apoptose (gesteuerter Zelltod) bestehen. Ebenfalls ist bekannt, dass eine HIV-Infektion die Apoptose durch vielfältige Mechanismen beeinflusst. Erfindungsgemäß konnte gezeigt werden,

dass unmittelbar nach der Applikation von Proteasom-Inhibitoren HIV-infizierte Zellen bevorzugt absterben, und zwar mit einer Kinetik, die sehr viel schneller ist als die Apoptose in nicht mit Proteasom-Inhibitoren behandelten HIV-infizierten Zellen. Diese Beobachtung hat für die therapeutische Anwendung von Proteasom-Inhibitoren bei HIV-Infektionen eine entscheidende Bedeutung: Nach Proteasom-Blockade werden HIV-infizierte Zellen im Organismus sehr viel schneller absterben, und die Menge an neuen Viruspartikeln wird dadurch wesentlich reduziert. Diese neue Eigenschaft beruht auf der Proteasom-Inhibitor(PI)-Domäne, also einer bekannten Substanz, für die erfindungsgemäß eine neue Wirkung nachgewiesen wurde. In Kombination mit dem neuartigen Prinzip der aktivierbaren TPI-Substanzen kann dadurch gezielt und ohne toxische Nebeneffekte auf nicht-infizierte Zellen die Zahl an HIV-infizierten Zellen im Organismus reduziert werden.

[0083] Die gezielte Induktion der Apoptose durch TPI-Substanzen hat eine weitere erfinderische Komponente – und zwar die, dass dadurch auch permanent mit HIV-infizierte Zellen aus dem Organismus entfernt werden können. Es ist ein großer Nachteil aller bisher applizierten anti-retroviralen Therapien, dass die Viruslast ("*viral load*") und damit die aktive Virusreplikation *in vivo* zum Beispiel durch HAART-Therapie faktisch auf Null reduziert werden kann. Trotzdem halten sich - vermutlich in zentralen lymphatischen Organen und Geweben - permanent infizierte Zellen. Als Konsequenz dieser Tatsache ist eine systematische Eliminierung einer HIV-Infektion zum gegenwärtigen Zeitpunkt faktisch unmöglich und wurde bislang auch bei keinen therapierten HIV-Infizierten beobachtet. Generell tritt innerhalb kurzer Zeit nach Absetzen der HAART-Therapie oder anderer anti-retroviraler Therapien eine Re-Aktivierung und wieder nachweisbare HIV-Replikation im peripheren Blut und lymphatischen Gewebe auf. Ein weiterer Nachteil der bisherigen anti-retroviralen Therapie besteht darin, dass die wieder aktivierten Virus-Spezies in der Regel Resistenzen gegen die applizierten Inhibitoren der reversen Transkriptase oder viralen Protease aufweisen.

[0084] Im Rahmen der Erfindung kann durch die Anwendung von TPI-Substanzen unter Ausnutzung des Pro-Drug-Prinzips selektiv das Absterben auch latent HIV-infizierter Zellen, insbesondere von Monozyten und Makrophagen, ausgelöst werden. Damit kann prinzipiell eine vollständige Eliminierung HIV-infizierter Zellen im Organismus erreicht werden. Da die Wirkung selektiv nur HIV-infizierte Zellen trifft, ist ein dauerhafter und hoch-dosierter Einsatz von TI-Substanzen aufgrund der faktisch nicht vorhandenen Nebenwirkungen möglich. Auf Grundlage dieses erfinderischen Prinzips könnte damit erstmalig eine vollständige Eliminierung einer HIV-Infektion im Organismus und damit eine vollständige Heilung eines HIV-Infizierten möglich werden.

[0085] Erfindungsgemäß wird dadurch erreicht, dass nach Applikation von TPI-Substanzen *in vivo* selektiv nur in HIV-infizierten Zellen die Funktion des UPS blockiert wird. Im Vergleich zu herkömmlichen Proteasom-Inhibitoren haben die erfindungsgemäß hergestellten neuartigen TPI-Inhibitoren den entscheidenden Vorteil, dass der Proteasom-Pathway nur in den gewünschten Zielzellen, z.B. in den HIV-infizierten Zellen oder in Tumorzellen, blockiert wird. Zellen, welche diese spezifische Protease (z.B. HIV-Protease) nicht exprimieren, werden durch TPI-Substanzen nicht beeinträchtigt. Dadurch werden toxische Nebenwirkungen bei einer Behandlung mit TPI-Substanzen im Vergleich zu den klassischen Proteasom-Inhibitoren wesentlich reduziert oder gar gänzlich ausgeschaltet. Aufgrund dieses Vorteils der reduzierten Toxizität kann weiterhin die Dosis und die Dauer des Einsatzes von TPI-Substanzen wesentlich erhöht und dadurch eine bessere therapeutische Wirkung erzielt werden.

[0086] Im Falle einer HIV-infizierten Zielzelle wird nach Aktivierung der TPI-Substanzen durch die virale Protease der Proteasom-Pathway komplett abgeschaltet. Bei *in vivo* Applikation von TPI-Substanzen kann daher die neuartige Klasse an TPI-Substanzen verschiedene therapeutische Effekte mit anti-viraler Wirkung auslösen. Bekannterweise bewirkt Proteasom-Inaktivierung, dass in einer HIV-infizierten Zelle späte Prozesse der Virusreplikation, also die Prozessierung der Gag-Strukturproteine, die Assemblierung, die Freisetzung und die nachfolgende Reifung von Virionen gestört ist. In der Summe dieser Wirkungen werden bedeutend weniger Virionen freigesetzt, und die freigesetzten Virionen sind in ihrer Infektiosität stark vermindert. Als Konsequenz wird durch Proteasom-Blockade die Neuinfektion weiterer Zellen und somit die Infektionsausbreitung im Organismus gestört.

[0087] Als weiterer wesentlicher Effekt der Proteasom-Inaktivierung bewirkt die Proteasom-Inaktivierung eine beschleunigte Apoptose. Da die Aktivierung von TPI-Substanzen erfindungsgemäß nur in den Virus-infizierten Zellen erfolgt, kann dadurch im Rahmen der Erfindung spezifisch das Absterben von z.B. HIV-infizierten Zellen im Organismus ausgelöst werden. In der Summe beider Wirkungen,

- (i) Störung der Freisetzung und Infektiosität von neuen Virionen, und
- (ii) selektives Absterben HIV-infizierter Zellen,

kann die Anwendung von diesen neuartigen Inhibitoren der TPI-Klasse die Ausbreitung einer HIV-Infektion im Organismus verhindern und gleichzeitig die Zahl der Zellen mit aktiver HIV-Replikation gesenkt werden. Diese Wirkung führt damit zu einer Senkung der Gesamt-Virus-Beladung ("viral load") bei gleichzeitiger Eliminierung aller Zellen mit aktiver Virusreplikation. Da diese neue Form von aktivierbaren TPI-Substanzen das UPS selektiv und nur HIV-infizierte

Zellen beeinflusst, sind die toxischen Nebenwirkungen bei Applikation solcher Art von Inhibitoren vergleichbar gering oder gar nicht vorhanden.

[0088] Die Aufgaben der Erfindung wurden durch den Einsatz von mindestens einem Proteasom-Inhibitor (PI) und / oder mindestens einem Trojanischen Proteasom-Inhibitor (TPI) gelöst. Es sind erfindungsgemäß Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen entwickelt worden, die als eine wirksame Komponente Proteasom-Inhibitoren in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten, so zur Hemmung von Filoviren. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen.

10 [0089] Es ist auch möglich, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflussen. Diese Inhibitoren können entweder eine oder mehrere oder alle drei hauptsächlich proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms (die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten) innerhalb des 26S- oder auch des 20S-Proteasom-Komplexes hemmen.

[0090] Eine Variante der Erfindung besteht darin, als Proteasom-Inhibitoren Substanzen einzusetzen, die von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit der katalytischen beta-Untereinheit des 26S-Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei 20 alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.

[0091] Als eine weitere Form der Erfindung kommen Mittel zum Einsatz, welche die Aktivitäten der Ubiquitin-konjugierenden wie auch der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme hemmen. Dazu gehören auch zelluläre Faktoren, die mit Ubiquitin - als Mono- oder auch als Poly-Ubiquitin - in Wechselwirkung treten. Poly-Ubiquitinierung gilt allgemein als ein Erkennungssignal für die 25 Proteolyse durch das 26S-Proteasom, und die Beeinflussung des Ubiquitin-Pathway kann ebenfalls die Aktivität des Proteasoms regulieren.

[0092] Erfindungsgemäß werden als Proteasom-Inhibitoren auch Substanzen eingesetzt, die in verschiedenen Formen in vivo oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, in verkapselter Form 30 mit oder ohne Zellspezifität-tragende Veränderungen, oder anderweitig verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität und/oder hohe Selektivität für bestimmte Zellen und Organe aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relativ hohe metabolische Halbwertszeit und eine relativ geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

[0093] Als Proteasom-Inhibitoren werden des weiteren Substanzen eingesetzt, die in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden, durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder total-synthetisch hergestellt werden oder durch gentherapeutische Verfahren in vivo synthetisiert oder durch gentechnische Verfahren in vitro oder in Mikroorganismen hergestellt werden. Dazu gehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Epoxomicin (Epoxomycin) und Eponemycin,
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),
- Lactacystin und dessen chemisch modifizierte Varianten, insbesondere die Zellmembranpenetrierende Variante "Clastolactacystein b-Lacton",

b) synthetisch hergestellte :

- - modifizierte Peptidaldehyde wie zum Beispiel N-carbobenzoxymethyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-carbobenzoxymethyl-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115); N-Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal (bezeichnet als LLnL); N-carbobenzoxymethyl-Ile-Glu(OBn)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);
- - Peptide, die C-terminal α,β -Epoxyketone (auch bezeichnet als Epoxomicin / Epoxomycin oder Eponemycin), Vinyl-sulphone (zum Beispiel Carbobenzoxymethyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucin-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetate-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucin-vinyl-sulfon, auch bezeichnet als NLVS), Glyoxal oder Borsäure-Reste (zum Beispiel Pyrazyl-CONH(CHPh)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂), auch bezeichnet als "PS-431" oder Benzoyl(Bz)-Phe-boroLeu, Phenacetyl-Leu-Leu-boroLeu, Cbz-Phe-boroLeu); Pinacol-Ester - zum Beispiel Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester - tragen;
- und
- - als besonders geeignete Verbindungen werden Peptide und Peptid-Derivate eingesetzt, die C-terminal Epoxyketon-Strukturen tragen; hierzu zählen beispielsweise Epoxomicin (Molekülformel: $C_{28}H_{86}N_4O_7$) und Eponemycin (Molekülformel: $C_{20}H_{36}N_2O_5$);
- - chemisch modifizierte Derivate auf der Basis von natürlich vorkommenden, insbesondere ein b-Lacton-Derivat mit der Bezeichnung PS-519 (1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptan-3,7-dione, Molekülformel: $C_{12}H_{19}NO_4$), welches sich von dem natürlichen Proteasom-Inhibitor Lactacystin ableitet;

- bestimmte Dipeptidyl-Borsäure-Derivate, insbesondere Verbindungen, welche sich von dem Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure-Derivat mit dem Namen "PS-341" (N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure, Molekülformel: C₁₉H₂₅BN₄O₄) ableiten. Hierzu zählen weiterhin die Verbindungen "PS-273" (Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293, die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-303 (NH₂(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-321 (Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); die Verbindung PS-334 (CH₃-NH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂); die Verbindung PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂). Alle diese Verbindungen wurden bereits beschrieben, unter anderem in Adams et al. (1999).
- 15 **[0094]** Als besonders geeignete Verbindungen haben sich, neben Epoxomicin und Eponemycin, die Proteasom-Inhibitoren PS-519, PS-341 und PS-273 (entwickelt von der Firma Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA 02139, USA) erwiesen. Diese Proteasom-Inhibitoren sind sehr potent, sehr spezifisch für das Proteasom, blockieren keine anderen zellulären Proteasen und haben daher so gut wie keine Nebenwirkungen. Die Proteasom-Inhibitoren PS-341 und PS-519
- 20 wurden außerdem sowohl in Tiermodellen für vorklinische als auch in Menschen (Krebspatienten) für klinische Studien getestet.
- [0095]** Mit den Proteasom-Inhibitoren werden erfindungsgemäß Mittel zur Verfügung gestellt, die überraschenderweise
- durch die Blockierung von späten Prozessen der Virus-Replikation die Produktion von infektiösen Nachkommen-Viren beeinträchtigen und damit die Ausbreitung der Infektion im Organismus verhindern;
 - die Freisetzung von infektiösen Filoviren (Lassa-, Marburg-, Ebola-, oder Krim/Kongo-Virus) aus infizierten Zellen blockieren;
 - die Ausbreitung einer akuten Infektion mit Filoviridae begrenzen;
 - 30 - die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen mit Filoviridae unterdrücken und den Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöhen.

[0096] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird gezeigt, dass überraschenderweise Proteasom-Inhibitoren die Funktion der Assemblierungs-Domäne von Ebola-Virus hemmen. Dazu wird im Ausführungsbeispiel – Figur 4 - unter Verwendung von pulse/chase- und Western Blot-Kinetik-Studien dargestellt, dass Proteasom-Inhibitoren ähnlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf Retroviren (wie zum Beispiel HIV und SIV) die Assemblierung und Freisetzung von chimären HIV/Ebola-Viren hemmen. Diese HIV/Ebola chimären Viren (HIBO-Viren) enthalten die Assemblierungsdomäne von Ebola EbVp40-Matrixprotein kloniert in die p6^{gag}-Domäne von HIV-1. Im Unterschied zu HIV-1 p6gag weist EbVp40 zusätzlich zu dem PTAP-Sequenzmotiv ein weiteres Assemblierungsmotiv PPXY auf (Martin-Serrano *et al.*, 2001). Es konnte erstmals gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren in Zellen, welche solche HIBO-Viren exprimieren, die Freisetzung und die Prozessierung der Gag-Strukturproteine gehemmt ist und dass diese Hemmung mit einer Intensität auftritt, die vergleichbar ist mit der hemmenden Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Gag-Prozessierung und Freisetzung von HIV-1 (siehe Ausführungsbeispiel 4). Dieses Phänomen wurde sowohl mittels metabolischer pulse/chase-Markierung als auch mittels Western Blot-Kinetik-Studien nachgewiesen.

[0097] In einer weiteren Form der Erfindung wird erstmals gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von "virus like particles" (VLP, Virus-ähnlichen Partikeln) von der Zelloberfläche blockieren. Zu diesem Zweck werden Expressionsvektoren für das EbVp40-Matrixprotein in Zellen eingebracht. Dabei wird der Umstand ausgenutzt, dass das EbVp40 ausreichend ist, um ähnlich dem HIV-1 Pr55gag-Protein VLP von der Zelloberfläche zu sekretieren, welche auch in Abwesenheit weitere Ebola-Proteine die typische Morphologie von authentischen Filoviren aufweisen. Wie im Ausführungsbeispiel 4 näher dargestellt, ist eindeutig zu erkennen, dass nach Behandlung der Zellen mit Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von Ebola-VLPs gehemmt ist. Damit wird erstmalig gezeigt, dass die Funktion des UPS ebenfalls notwendig ist für die Reifung und Freisetzung von Filoviren und dass dadurch Proteasom-Inhibitoren für die Hemmung der Filovirusreplikation einsetzbar sind. Damit wurde zum ersten Mal der Hinweis dafür erbracht, dass Proteasom-Inhibitoren für die Therapie von viralen hämorrhagischen Fiebern einsetzbar sind.

[0098] Da Filoviren und insbesondere Lassa- und Ebolaviren die Existenz von Virus-spezifischen Proteasen als notwendig für die korrekte Prozessierung der viralen Strukturproteine aufweisen, ist damit auch die Anwendung des TPI-Prinzips gegeben. Durch den Einsatz von TPI-Substanzen, die eine für Lassa-, Marburg-, Ebola-, oder Krim/Kongo-Virus spezifische Protease-

Erkennungsstelle tragen, können diese Substanzen zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionen mit Erregern des hämorrhagischen Fiebers eingesetzt werden.

[0099] Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe, neue Inhibitoren als anti-retrovirale
5 Medikamente zur Verfügung zu stellen, wurde auch durch die Bereitstellung von Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) gelöst. Das Wesen der Erfindung besteht für diesen Teil darin, dass erstmals ein spezifischer L-Domäneninhibitor geschaffen wurde, der die Wechselwirkung von viralen L-Domänen mit zellulären Faktoren und dadurch die späten Prozesse eines viralen Replikationszyklus, speziell die Assemblierung der Virusproteine an der Zellmembran, das
10 Budding und die Freisetzung sowie die Reifung von Nachkommenviren blockieren kann. Im Ergebnis dieser neuartigen Wirkung kann dadurch überraschenderweise die Produktion von infektiösen Nachkommenviren von einer infizierten Zelle unterbunden werden. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, dass diese durch spezifische Wirkung dieser Inhibitoren gezielt die Funktion der viralen L-Domäne, jedoch nicht andere zelluläre Funktionen beeinträchtigen.

15 [0100] Die erfindungsgemäßen Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren bestehen aus einem Fusionat von zwei aktiven Komponenten, aus Assemblierungs-Inhibitoren und aus trojanischen Peptiden. Eines ihrer wesentlichen Merkmale ist darin zu sehen, dass sie in der gewünschten Zielzelle - einer Virus-infizierten Zelle - aktiviert werden. Ihre Aufnahme in die gewünschten Zielzelle erfolgt unter Verwendung Zellmembran-transduzierender Eigenschaften mittels der
20 trojanischen Peptide.

[0101] Die erfindungsgemäßen Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren bestehen aus je einer transduzierenden Domäne, je einer Linker-Domäne und je einer Assemblierungs-Inhibitor-Domäne. Die Assemblierungs-Inhibitor Domäne kann weiterhin wahlweise durch eine Erkennungsstelle für eine virale Protease, vorzugsweise der HIV-1 Protease, mit der
25 Linkersequenz verbunden werden. In einer weiteren Ausführungsform kann die Assemblierungs-Inhibitor Domäne ebenfalls direkt an die Linkersequenz fusioniert werden. Im letzteren Fall wird die Assemblierungs-Inhibitor Domäne nicht aus dem Molekül durch die virale Protease herausgespalten.

[0102] Die transduzierende Domäne setzt sich aus einer 8 bis 15 Aminosäuren langen Sequenz
30 zusammen, welche die Fähigkeit zur Zelltransduktion besitzt. Die Linker-Domäne besteht aus einer 3 bis 6 Aminosäuren langen Poly-Glycin-Sequenz, welche die transduzierende Domäne mit der Assemblierungs-Inhibitor-Domäne verbindet. Die Assemblierungs-Inhibitor-Domäne schließlich besteht aus einer 4 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz, die eine späte (late, L) Assemblierungsdomäne von viralen Strukturproteinen enthält. Hierzu zählen:

- a. die Aminosäuresequenz P-T-A-P des p6^{Gag}-Proteins des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1);
 - b. die Aminosäuresequenz P-P-P-Y des p12^{Gag}-Proteins des murinen Leukämievirus (MuLV);
 - 5 c. die Aminosäuresequenz Y-P-D-L des p9^{Gag} des Pferde-Anämie-Virus (EIAV);
 - d. die Aminosäuresequenz P-T-A-P-P-E-Y des VP40 Matrix-Proteins von Ebola-Virus sowie
 - e. die Aminosäuresequenz P-P-x-Y (x steht für eine beliebige Aminosäure) des Rous-Sarcoma-Virus (RSV) des Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV) sowie des MuLV.
- 10 [0103] Ein weiteres Merkmal der erfindungsgemäßen Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren besteht darin, dass als Effektor-Domäne die Assemblierungs-Inhibitor-Domäne während oder unmittelbar nach Zellaufnahme die Wechselwirkung von viralen Strukturproteinen mit zellulären Faktoren, wie zellulären Proteinen und Enzymen, blockiert. Hierzu zählen:
- a. zelluläre Chaperone und Faltungsenzyme, die an virale L-Domänen binden;
 - 15 b. zelluläre Protein-modifizierende Enzyme, wie Proteasen, Phosphatasen, Kinasen;
 - c. zelluläre Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems, wie Ubiquitin-Ligase und/oder Ubiquitin-Hydrolasen sowie
 - d. zelluläre Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems, die insbesondere die Mono-Ubiquitinylierung der L-Domäne enthaltenden viralen Strukturproteine blockieren.

20

[0104] Im Ergebnis einer therapeutischen Anwendung der erfindungsgemäßen neuartigen Inhibitoren TAI können erstmals spezifisch die Produktion von Nachkommenviren und damit die Ausbreitung der Infektion im Organismus inhibiert werden, ohne dabei andere, nicht viral infizierte Zellen im Organismus zu beeinflussen. Aufgrund der nicht zu erwartenden toxischen Nebenwirkungen können diese neuartigen Inhibitoren in relativ hoher Dosis und über einen relativ langen Behandlungszeitraum verabreicht werden.

[0105] Ähnlich der Klasse Trojanischer Proteasom-Inhibitoren (TPI) nutzen die Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) das Prinzip der Einbringung eines Effektormoleküls in die Targetzelle durch Verwendung des Zell-transduzierenden Prinzips trojanischer Peptide aus. Demnach besteht die Klasse der TAI-Moleküle aus einem 3 bis 6 Aminosäure langen Gly-Linker, dem eine L-Domänen-Sequenz folgt. Im Unterschied zu den TPI-Molekülen tritt bei den TAI-Molekülen anstelle einer Proteasom-Inhibitor-Komponente eine L-Domänen-Inhibitor-Komponente als Effektor auf (Figur 5). In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung

wird hierzu die PTAP-Sequenz von HIV-1 p6^{Gag} eingesetzt. Weitere Sequenzen können als L-Domänen in der Gestaltung von TAI Molekülen Verwendung finden.

[0106] Als wesentliches Prinzip der TAI werden erfindungsgemäß Virus-infizierte Zellen mit TAI behandelt. Diese Behandlung kann in Zellkultur oder nach Applikation dieser Substanzen in Virus-infizierte Organismen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführung werden HIV-infizierte T-Zellen mit TAI behandelt, welche die PTAP L-Domäne des HIV-1 p6gag-Proteins beinhalten (TAI-PTAP). Nach Gabe von TAI-PTAP werden diese Inhibitoren effizient und in kürzester Zeit von den Zellen aufgenommen. Nach Zellaufnahme kann in einer weiteren Ausführungsform durch proteolytische Spaltung des TAI-Prodrugs die L-Domänen-Komponente durch spezifische Aktivität der viralen Protease gespalten werden.

[0107] Vorteil dieser Ausführung ist, dass nach proteolytischer Freisetzung der L-Domänen diese nicht mehr im Verbund mit der transduzierenden stark basisch geladenen Domäne in der inhibierenden Wirkung beeinträchtigt werden kann.

[0108] In einer weiteren Ausführungsform können auch TAI-Moleküle zur Anwendung kommen, die keine spezifische Protease-Spaltstelle enthalten und als Gesamt-Molekül intrazellulär wirksam werden.

[0109] Erfindungsgemäß wird nach Zellaufnahme ein TAI-Molekül als kompetitiver Inhibitor wirksam, indem es die Bindung zellulärer Assemblierungsfaktoren an die viralen Strukturproteine, im Falle von HIV-1 an die L-Domäne in p6gag des Pr55 Gag-Prekursorproteins, verdrängt. Aufgrund der effizienten Zelltransduktion dieser TAI-Moleküle kann eine ausreichende intrazelluläre TAI-Konzentration an TAI-Molekülen erzielt werden, welche zu einer wirksamen Verdrängung zellulärer Bindungspartner aus den Virusassemblierungs-Komplexen führt.

[0110] Weiterhin ist erfindungsgemäß gezeigt worden, dass Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) der Wirtszelle mit p6^{Gag} in Wechselwirkung treten und dadurch späte Prozesse der Virusassemblierung von HIV-1 und HIV-2 inhibiert werden können. Zusammengefasst muss jedoch eingeschätzt werden, dass sowohl die Natur aller zellulären Faktoren als auch die konkreten Mechanismen des Virusbudding in seinem Wechselspiel zwischen zellulären und viralen Proteinen bislang wenig verstanden ist. Es wird jedoch angenommen, dass dieser Prozess bei verschiedenen Familien umhüllter Viren konserviert ist. Beispielsweise sind Prolin-enthaltende L-Domänen mit der Konsensussequenz P-P-X-Y (X steht für eine beliebige Aminosäure) für Vertreter der Filo-, Orbi-, Rhabdo- und Oncoretroviren gefunden worden (Vogt, 2000). Da all diese L-Domänen unabhängig von ihrer Position in viralen

Gag-Proteinen wirksam werden, kann davon ausgegangen werden, dass L-Domänen grundsätzlich als Andock-Stellen von zellulären Proteinen im Prozess der Virusassemblierung und des Budding dienen. Diese Wechselwirkung zwischen viralen L-Domänen und den zahlreichen zellulären Faktoren, welche das Budding dieser Viren regulieren, kann in der Summe
5 durch das neuartige Prinzip der TAI-Peptide blockiert werden.

[0111] Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kombinationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantrag
10 wird. Die Erfindung liegt auch in einem kombinierten Einsatz von bekannten und neuen Elementen – Inhibitoren und trojanischen Peptiden einerseits sowie Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) und Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) andererseits.

[0112] Das Wesen der Erfindung liegt auch in der Verwendung bekannter Mittel (Proteasom-Inhibitoren, Assemblierungs-Inhibitoren) zu einem neuen Zweck und in einer Kombination aus
15 bekannten und neuen Elementen – Proteasom-Inhibitoren, trojanische Peptiden, transduzierende Domäne, Linker-Domäne, Protease-Spaltstelle, Effektor-Domäne und Trojanischen Proteasom-Inhibitoren / Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren – was dazu führt, dass die Toxizität von Proteasom-Inhibitoren weitgehend beseitigt wird, die Möglichkeit aufgezeigt wird, eine vollständige Heilung eines Virus-Infizierten zu erreichen und schließlich eine neue
20 Gesamtwirkung einen Vorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass nunmehr die Toxizität von Proteasom-Inhibitoren beseitigt wird und erstmals eine Möglichkeit aufgezeigt wurde, eine vollständige Heilung eines HIV-Infizierten zu erreichen und des weiteren Mittel zur Vorbeugung, Behandlung, Therapie und Hemmung von Filoviren und damit Mittel zur Behandlung von Infektionen mit Erregern des hämorrhagischen Fiebers zur Verfügung stehen.

[0113] Die Kombination führt in ihrer Gesamtheit zu einem synergistischen Effekt, der darin besteht, dass durch die TAI erstmals ein spezifischer L-Domäneninhibitor geschaffen wurde, der die Wechselwirkung von viralen L-Domänen mit zellulären Faktoren und dadurch die späten Prozesse eines viralen Replikationszyklus - speziell die Assemblierung der Virusproteine an der Zellmembran, das Budding und die Freisetzung sowie die Reifung von Nachkommenviren -
30 blockiert.

[0114] Die erfindungsgemäß hergestellten neuartigen Trojanischen Inhibitoren (TI-Stoffe) sind ebenfalls dazu geeignet, in einer Virus-infizierten Zelle gezielt Apoptose auszulösen, und im Ergebnis dieses gezielten Zelltodes können im infizierten Organismus die Virus-produzierenden Zellen gezielt eliminiert werden.

[0115] Die erfindungsgemäßen Verwendungen der Trojanischen Inhibitoren (TI) liegen in der Herstellung von Arzneimitteln, vor allem von Arzneimitteln zur Behandlung viraler Infektionen und insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine spezifische Protease exprimiert wird. Sie eignen sich zur Blockierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway in der
5 Zielzelle und zur Behandlung von viralen Infektionen, bei denen eine Virus-spezifische Protease exprimiert wird.

[0116] Die erfindungsgemäßen TI finden Verwendungen

- bei der Behandlung von AIDS und Erkrankungen, die durch humane Immundefizienzviren (HIV) verursacht werden
- 10 - zur Behandlung von Tumorerkrankungen
- als Pro-Drug und/oder
- als Mittel zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren dadurch, dass sie die späten Prozesse im Replikationszyklus von Retroviren hemmen.

[0117] Generell finden die erfindungsgemäßen Trojanischen Proteasom-Inhibitoren in
15 pharmazeutischen Zubereitungen Verwendung zur Behandlung von Virus-Infektionen, insbesondere von Infektionen mit viralen Erregern, welche entweder akute (zum Beispiel hämorrhagische Fieber) oder lang andauernde chronische (zum Beispiel AIDS oder Hepatitis) Erkrankungen auslösen.

20 [0118] Im Falle von Retroviren eignen sie sich dazu, die proteolytische Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease zu hemmen, insbesondere die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Säpumaviren oder
- b) Mammalian C-Typ Oncoviren oder
- 25 c) BLV (Bovine Leukemia Virus) oder
- d) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) oder
- e) Leukämieviren oder
- f) RSV (Rous-Sarcoma-Virus) oder
- g) Lentiviren.

30 [0119] Im Fall einer Infektion mit Leukämieviren lassen sie verwenden zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) BLV oder
- b) HTLV-I oder
- c) HTLV-II,

im Fall einer Infektion mit Lentiviren zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) oder
- b) Humanes Immundefizienzvirus Typ 2 (HIV-2) oder
- 5 c) Affen-Immundefizienzvirus (SIV) oder
- d) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) oder
- e) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV).

[0120] Die Verwendung von Trojanischen Inhibitoren bezieht sich auch auf die Bekämpfung / Behandlung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die

- 10 - durch Infektionen mit Retroviren verursacht wurden, wie Infektionen mit Leukämieviren, humanen T-Zell Leukämieviren HTLV-I und HTLV-II oder
- durch Infektionen mit Lentiviren
- verursacht wurden.

[0121] Dadurch eignen sie zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS, auch in Kombination mit

- 15 - anderen anti-retroviralen Medikamenten
- Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease
- anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen
- intrazellulärer Immunisierung
- dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und / oder
- 20 peripheren CD4+-Lymphozyten wie auch
- zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS in fortgeschrittener Krankheitsphase
- zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2 infizierten Personen
- 25 - zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns oder
- zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1/HIV-2-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-
- 30 kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.

[0122] Die erfindungsgemäßen TI finden ferner Verwendung

- als Mittel zur Beeinflussung, Hemmung oder Regulierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway

- als Mittel zur Beeinflussung der enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur
- zur Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen
- 5 - zur Induktion der Apoptose speziell in HIV-infizierten Zellen
- zur Blockierung der Aktivität des Faktors NF- κ B, insbesondere zur Induktion von Apoptose sowie für die effiziente Transkription des HIV-Promoters und somit der Transkriptionsaktivierung in latent infizierten Zellen.

[0123] Die erfindungsgemäßen TI lassen sich auch verwenden zur Blockierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway in bestimmten Targetzellen, wobei die Targetzellen Tumor-Zellen oder von Pathogenen befallene Wirtszellen sind, z.B. bei den Pathogenen

- Zellparasiten, wie Bakterien, Mykoplasmen, Pilze, Hefen und /oder andere pro- und eukaryotische Mikroorganismen und / oder
- Viren wie Influenza-, Papilloma-, Herpes-, Ebola- oder andere humanpathogene Viren
- 5 sowie Immundefizienz auslösende Lentiviren.

[0124] Schließlich finden die Trojanischen Inhibitoren Verwendung zur Beeinflussung von Zielzellen in ihren zellulären Mechanismen: Zellteilung, Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Zelltod (Apoptose), Zellaktivierung, Signaltransduktion oder Antigenprozessierung, z.B.

- zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen oder
- 0 - zur Auslösung eines anti-neoplastischen Effektes durch Beeinflussung der Zellteilung in Tumorzellen.

[0125] Generell finden die erfindungsgemäßen Trojanischen Inhibitoren / Proteasom-Inhibitoren und ihre Kombinationen in pharmazeutischen Zubereitungen Verwendung zur Behandlung von Virus-Infektionen, im Rahmen dieser Erfindung insbesondere zur Behandlung und Vorbeugung von viralen hämorrhagischen Fiebrern (VHF) in Menschen und Tieren, insbesondere in non-humanen Primaten (Affen) und ihre Verwendung zur Herstellung von Mitteln zur Bekämpfung / Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die

- durch Infektionen mit den Filoviren Ebolavirus und Marburgvirus oder
- durch Infektionen mit Lassa-Virus oder Krim/Kongo-hämorrhagischen-Fieber-Virus
- 0 verursacht wurden.

[0126] Die erfindungsgemäßen TI finden ferner Verwendung

- als Mittel zur Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen, speziell in Filoviren-infizierten Zellen

- zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Virus-Infektionen, von viralem hämorrhagischen Fieber, von Infektionen mit Filoviridae sowie zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Filoviridae
- zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen Filoviren-infizierten Personen
- zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen Filoviren-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Filoviren-kontaminiertem Blut oder kontaminierten Blutprodukten.

10 [0127] Die Verwendung der TAI- und TPI-Substanzen bezieht sich in gleicher Weise auf pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitisviren. Das TPI- wie auch das TAI-Prinzip lässt sich sowohl für die Behandlung von viralen Hepatiden einsetzen, dabei insbesondere zur Vorbeugung, Therapie und Hemmung der von verschiedenen Mitgliedern der Virusfamilie Flaviviridae (Genera: Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus) verursachten

15 Krankheiten beim Menschen und bei Tieren, insbesondere von Hepatitis-C-Viren (HCV). Da ähnlich HCV ebenfalls Hepatitis-B-Viren (HBV) von der Zelloberfläche budden und Abschnitte des HBV-Replikationszyklus von der Aktivität des UPS abhängen, kann das Prinzip der TAI- und der TPI-Moleküle ebenfalls für die Vorbeugung und die Therapie von HBV-Infektionen und der dadurch bedingten Leberentzündung eingesetzt werden. Aufgrund der besonderen

20 Eigenschaften ermöglichen die Trojanischen Inhibitoren die Blockierung der Produktion von infektiösen HBV und HCV und damit die Verhinderung der Infektionsausbreitung *in vivo*, zum Beispiel dem Leber-Gewebe einer HCV- oder HBV-infizierten Person.

[0128] Ein weiteres Anwendungsgebiet bezieht sich auch darauf, dass die Trojanischen

25 Inhibitoren als "Drug-Delivery-System" einsetzbar sind. Eine weitere Verwendung ist dadurch gekennzeichnet, dass durch Einsatz transduzierender Systeme die Trojanischen Inhibitoren aufgrund der Zellmembran-transduzierenden Wirkung der trojanischen Peptid-Sequenzen, enthalten in den Pro-Drugs, die Blut-Hirnschranke überwinden und damit ebenfalls im neuronalen Gewebe aktiv werden und infizierte Zellen aus neuronalem Gewebe des

30 Zentralnervensystems entfernt werden können.

[0129] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Virusproteasen

5 Zuordnung der Virusproteasen:

[0130] Die erfindungsgemäßen Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) weisen Protease-Spaltstelle aus einer 6 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz auf, die eine optimierte Erkennungssequenz für virale Proteasen, die im Prozess des viralen Replikationszyklus durch virale Genexpression in der infizierten Zelle gebildet werden und virale Polypeptide spalten.

10 Dazu gehören virale Proteasen aus der Familie der

a) Retroviridae wie zum Beispiel Human immunodeficiency virus 1 und 2, Simian immunodeficiency virus, Equine infectious anemia virus (alle Genus Lentivirus), Human T-lymphotropic virus 1 und 2 (Genus Deltaretrovirus), Mason-Pfizer monkey virus (Genus Betaretrovirus), Murine leukemia virus (Genus Gammaretrovirus)

15 - eine einzelne Unterklasse aus der Familie der Asparaginsäure-Proteasen

b) Picornaviridae wie zum Beispiel Poliovirus, Coxsackievirus (alle Genus Enterovirus), Human rhinovirus A (Genus Rhinovirus), Hepatitis A virus (Genus Hepatovirus)

- zwei virale Proteasen 2A und 3C (two viral proteases designated 2A and 3C)

20 c) Flaviviridae wie zum Beispiel Tick-borne encephalitis virus, Dengue virus, Gelbfieber virus (alle Genus Flavivirus), Hepatitis C virus (Genus Hepacivirus)

- NS3-Protease, Serin-Protease

d) Adenoviridae wie zum Beispiel Human adenovirus C (Genus Mastadenovirus)

- Adenovirus-Proteinase (AVP), Cystein-Protease

25 e) Asfarviridae wie zum Beispiel African swine fever virus (Genus Asfivirus)

- Afrikanische Schweinepestvirus-Protease, Cystein-Protease aus SUMO-1 (einer spezifischen Protease-Familie)

[African swine fever virus protease, cysteine protease from the SUMO-1-specific protease family]

30 f) Herpesviridae wie zum Beispiel Human cytomegalovirus (Betaherpesvirinae), Pseudorabies virus (Alphaherpesvirinae), Humanes Cytomegalo-Virus (human cytomegalovirus, HCMV), HCMV-Protease und andere virale Serin-Proteasen (HCMV protease serine protease)

- g) Birnaviridae wie zum Beispiel Infectious bursal disease virus (Genus Avibirnavirus), Infectious pancreatic necrosis virus (Genus Aquabirnavirus), VP4-Protease sowie anderen viralen Serin-Proteasen
- h) Arteriviridae wie zum Beispiel Equine arteritis virus (Genus Arterivirus), Protease nsp4 und andere virale Proteasen
- i) Coronaviridae wie zum Beispiel Avian coronavirus infectious bronchitis virus, Mouse hepatitis virus (alle Genus Coronavirus), "3C-ähnliche Protease", "Papain-ähnliche Cystein Protease 1", Virusprotease "PCP-1" und anderen viralen Proteasen (3C-like proteinase, papain-like cystein proteinase 1 (PLP1)), virus-encoded protease PCP-1
- j) Togaviridae wie zum Beispiel Sinbis virus (Genus Alphavirus) Protease "nsP2" und anderen viralen Proteasen (proteolytic enzyme encoded in the C-terminal half of nsP2) oder der
- k) Filoviridae wie zum Beispiel Marburg- oder Ebola-Virus, Lassa- oder Krim/Kongo-Virus.

Beispiel 2: Synthese und Reinigung von TI-Molekülen

Beispiel 2a: Chemische Synthese von TI-Molekülen - Allgemeine Vorschrift

[0131] Die chemische Totalsynthese von TI-Molekülen erfolgte an einem Serin-Harz der Fa. Rapp Polymere Tübingen an einem ABI 433A Synthesizer (Perkin Elmer). Alle N-terminalen Peptide wurden an einem Polystyren-polyoxyethylen-Trägerharz (TentaGel R-RAM-Harz der Fa. Rapp Polymere) synthetisiert. Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels FMOC-Strategie (Fluormethyloxycarbonyl) unter Verwendung nachfolgender Schutzgruppen:

[0132] O-t-Butylester für Glu und Asp, OtBu-Ether für Serin, Tyrosin und Threonin, Boc (tert-Butoxycarbonyl-) für Lysin und Tryptophan, Trt (Trityl - Triphenylmethyl) für Histidin, Glutamin und Asparagin sowie Pbf (2.2.4.6.7-pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-) für Arginin. Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung der Schutzgruppen mittels eines Abspaltungsgemisches, bestehend aus 95% Trifluoressigsäure, der 3% Triisopropylsilan und je nach Peptid 2 bis 5 % Ethandithiol. Das Harz wurde abgetrennt, die Reaktionslösung eingeengt und mit Heptan versetzt. Es wurde erneut eingeengt und das verbleibende Öl mit Diethylether digeriert. Das rohe Peptid wurde abgesaugt und anschließend aus 10%iger Essigsäure lyophilisiert.

Beispiel 2b: Reinigung der TI-Peptide - Allgemeine Vorschrift

[0133] Zur Reinigung wurden jeweils 100 mg Rohpeptid an einer präparativen HPLC-Anlage (Shimadzu LC-8 Anlage) chromatographiert. Alle Peptide wurden an einer Kieselgelsäule (300 x

400 mm Vydac-RP18-Säule, Korngröße 15 - 20 μ) mittels eines linearen Gradienten, bestehend aus A = 1% TFA (Trifluoressigsäure) in Wasser und B = 0,1% TFA in 80%igem Acetonitril mit einem Fluss von 100 ml / min gereinigt. Die Eluate wurden eingengt und lyophilisiert.

5 Beispiel 3: Bestimmung der inhibitorischen Konstanten für TI-Substanzen

[0134] Die inhibitorische Konstante (K_i) für die einzelnen TI-Peptide wurde unter Verwendung eines fluorometrischen Assays nach Stein et al. (1996) durchgeführt. Dazu wurde als Substrat Carbobenuloxyleu-Leu-Leyu-Val-Tyr-amino-methyl-coumarin sowie gereinigte 20S Proteasomen eingesetzt.

10

Beispiel 4: Bestimmung der Apoptose in HIV-infizierten Zellen

[0135] Die Wachstumskurven einer HIV-infizierten T-Zellkultur wurde nach Standardbedingungen bestimmt. Hierzu wurden Kulturen von humanen CD4+ T-Zellen, A3.01, mit HIV-1NL4-3 infiziert und für ca. 7 Tage in RPMI kultiviert. Ca. 80% des Zellkulturmediums
15 wurde alle zwei Tage erneuert. Zur Bestimmung der Menge an freigesetzten Viruspartikeln wurden Proben der Zellkulturüberstände auf Aktivität von Virus-assoziiierter Reverser Transkriptase (RT) untersucht. Parallel zur Bestimmung der RT-Aktivitäten wurde während des Infektionsexperimentes die Zahl der lebenden Zellen durch Tryphanblau-Ausschluss zu jedem Zeitpunkt des Mediumwechsel ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen.

20 [0136] Weiterhin wurde die Infektionsausbreitung durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-CA Antikörpern verfolgt. Der Zeitpunkt der maximalen Infektionsausbreitung in der Kultur wurde anhand der RT-Akkumulation sowie der Synzytia-Formierung ermittelt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 7 Tage post infectionem). Zum Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation wurden die Kulturen geteilt, und zu einer der parallelen Kulturen wurden
25 Proteasom-Inhibitoren (zum Beispiel 10 μ M von zLLL) gegeben und nach dem obigen Prinzip weiter kultiviert. Anhand der Absterbe-Kurve ist deutlich zu erkennen, dass unmittelbar nach Zugabe von Proteasom-Inhibitoren die HIV-infizierte Kultur einen sehr starken Verlust an lebenden Zellen erleidet, während in der nicht mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Kultur das Absterben der Kultur deutlich verzögert ist und der typischen Dynamik einer Zellzahl in einer
30 HIV-infizierten T-Zellkultur entspricht. Weiterhin wurde durch Verwendung des Tunnel-Assays und durch Annexin-Färbung festgestellt, dass in der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Kultur die Zahl der apoptotischen Zellen unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors extrem ansteigt und damit die durch Tryphanblau-Ausschluss bestimmten Verlust an lebenden Zellen erklären kann. Hierfür wurden A3-01 Zellen mit HIV-1 infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen

Virusreplikation und am Tag 5 der Infektion mit >50% der Zellen infiziert, dann wurde die Kultur geteilt und ein Teil der Zellen in Gegenwart von 1µM des Proteasom-Inhibitors zLLL kontinuierlich weiter kultiviert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen mit Annexin-phycoerythrin behandelt und mittels Flowcytometrie analysiert.

5

Beispiel 5:

In vitro Prozessierungs-Studien von TPI-Substanzen mit rekombinanter HIV-Protease

Beispiel 6:

10 Studien der in vitro Aktivierung von TI-Substanzen mittels Proteasom-Inhibierungs-Assay

Beispiel 7:

Studien zur Zelltransduktion mittels TI-Substanzen:

15 Beispiel 8:

Analyse der inhibitorischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusfreisetzung und die Gag-Prozessierung von HIV-1 und HIV-1/EBOLA chimären Viren mittels Western blot-Techniken.

[0137] Wie in Fig. 4 dargestellt, wurden HeLa-Zellen mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 Wildtyp (wt, oberer Abschnitte) sowie dem chimären Klon HIV/p6/PTAP (HIV-1NL4-3 + EBOLA L-Domäne, untere Abschnitt) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden parallele Ansätze der transfizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren (10 µM zLLL und 10 microM LC (+INHIBITOREN)) im Medium oder ohne Inhibitoren (NO INHIBITOR) behandelt, und jeweils identische Teile der Zellkultur wurden nach 1, 2, 4 und 8 Stunden Kultivierung
20 gewonnen. Die viralen Partikel wurden mittels Zentrifugation isoliert und Lysate der Virus- und Zell-Fractionen in einer 12%igen SDS-PAGE (SDS – Natriumdodecylsulfat, sodium dodecylsulfate; SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und die Gag-Proteine durch Fluorographie dargestellt. In Figur 4 ist anhand dieser Western Blot-Kinetik-Studie ebenfalls festzustellen, dass die EBOLA-L-Domäne im Kontext von HIV-1 wirksam ist,
25 und dass dieses chimäre Virus in dem gleichen Maße auf die inhibitorische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reagiert wie Wildtyp HIV-1.

Beispiel 9:

Analyse der inhibitorischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Freisetzung von EBOLA-Virus-ähnlichen Partikeln mittels Western Blot- und Pulse/Chase-Kinetik.

[0138] Ähnlich dem L-Domäne enthaltenden p6gag-Protein von HIV-1 befindet sich im N-Terminus des EBOLA Matrix-Proteins EbVp40 eine L-Domäne, welche wie bei HIV-1 in Position 7 mit der Sequenz PTAPP beginnt. Es wurde bereits gezeigt, dass diese Domäne, insbesondere Prolin in Position 7, für die Freisetzung von EBOLA-Virus-ähnlichen Vp40 Partikeln notwendig ist (Martin-Serrano *et al.*, 2001). Expressionsvektoren für die Expression von EbVp40 Proteinen sind bekannt, diese wurden in HeLa-Zellen transformiert, und 20 Stunden nach Transfektion wurde ein pulse-chase-Experiment ähnlich dem in Figur 4 beschriebenen durchgeführt. Parallele Kulturen wurden mit Beginn des Pulse/Chase-Experimentes mit Proteasom-Inhibitoren behandelt. EbVp40 Protein wurde immunpräzipitiert und in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt (A). In einem weiteren Experiment wurden EbVp40 exprimierende HeLa-Zellen einem Western Blot-Kinetik-Experiment unterzogen. Virale Partikel wurden im Verlauf der Behandlung mit Inhibitoren durch Zentrifugation gewonnen, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot angefärbt.

[0139] Zum Zwecke der biochemischen Analyse der hemmenden Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Kinetik der Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von HIV-1/EBOLA-Chimären-Viren wurden Pulse-Chase-Analysen durchgeführt. Die experimentellen Details der Infektion, Kultivierung, DNA-Transfektion und Pulse/Chase-Experimente werden wie folgt zusammen gefasst:

[0140] Hierzu wurden Kulturen von HeLa-Zellen eingesetzt, die mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 Wildtyp (wt, oberer Abschnitt) sowie dem chimären Klon HIV/p6/PTAP (HIV-1NL4-3 + EBOLA L-Domäne, untere Abschnitt) transfiziert wurden. Dieser chimäre Klon enthält die L-Domäne von EBOLA Vp40 Matrix-Protein in Form der Sequenz PTAPPEY, kloniert in die Region der L-Domäne von HIV-1NL4-3 innerhalb der kodierenden Region von p6gag (Martin-Serrano *et al.*, 2001). Wie in Figur 4 dargestellt, wurden in der Regel parallele Kulturen zum Zeitpunkt der maximalen Expression von HIV-Porteinen für 30 min einer Methionin-Depletion unterzogen, anschließend für 30 min mit [³⁵S]-markiertem Methionin metabolisch Puls-markiert und nachfolgend in einem Chase-Medium mit einem Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem Methionin für einen Zeitraum von 8 Stunden inkubiert. Die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren begann in der Regel mit dem Zeitpunkt der Methionin-Depletion und wurde über den gesamten Versuchszeitraum (Depletions-, Puls-, und Chase-Phase aufrecht erhalten). Proteasom-Inhibitoren wurden entweder selektiv (10 microM zLLL, oder in

Kombination (10 microM zLLL und 10 microM LC) eingesetzt. Aliquote Zellkulturen wurden zu jedem Zeitpunkt des Chases gewonnen und durch Zentrifugation in Zell-, Virus- und Zellkulturüberstand-Fractionen aufgetrennt. Die radioaktiv markierten HIV-Proteine wurden mittels Standard-Immunpräzipitation unter Verwendung von AIDS-Patientenseren sowie Gag-spezifischen Antikörpern unter Verwendung von bereits beschriebenen Methoden (Schubert *et al.*, 2000) isoliert, in der SDS-PAGE aufgetrennt, und anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image-Analyse. In der Regel wurden die relativen Mengen an Gag-Polypeptid und dem Hauptprozessierungsprodukt CA für jeden Chase-Zeitpunkt jeweils in der Zell-, Virus- und der Zellkultur-Fractionen bestimmt. Die Kinetik der Virusfreisetzung wurde als der prozentuale Anteil von Gag-Proteinen in der Virus-Fraction relativ zu der Gesamt-Menge an Gag (ermittelt in den Zell-, Virus-, und Zellkultur-Fractionen) pro Zeitpunkt des Chases dargestellt. Die Kinetik der intrazellulären Gag-Prozessierung wurde als der Quotient der Mengen von CA durch Pr55 über den gesamten Chase-Zeitraum berechnet. Nach Proteasom-Inhibierung tritt eine deutliche Verringerung der Virusfreisetzung sowie eine Verzögerung in der Gag-Prozessierung innerhalb des 8-stündigen Chase-Zeitraumes auf. Ebenfalls ist die Akkumulation unvollständiger Spaltprodukte, wie zum Beispiel von p25CA, in den CELL-Fractionen deutlich zu erkennen (kürzere Exposition des Fluorogramms im Molekulargewichtsbereich 20 bis 30 kDa jeweils unter den Abschnitten dargestellt). Dieser hemmende Effekt der Proteasom-Inhibitoren ist spezifisch für die Prozessierung der Gag-Strukturproteine. Die Expression und proteolytische Reifung der Hüllproteine gp160 und gp120 werden nicht von den Proteasom-Inhibitoren beeinflusst. Der Vergleich des oberen und des unteren Abschnittes lässt deutlich erkennen, dass die EBOLA-L-Domäne die Assemblierungsfunktion der L-Domäne von HIV-1 p6gag komplementiert und ähnlich Wildtyp HIV-1 auf die hemmende Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reagiert.

25

Beispiel 10:

Studien zur Aktivierung von Proteasom-Inhibitoren aus Prodrug Trojator-Substanzen

- [0141] (A) Eine Verdünnung des TPI-Substanz wurde in Retikulozyten-Lysaten mit einer Verdünnung von rekombinanter HIV-1-Protease (PR) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der in dem Lysat enthaltenen 26S Proteasomen unter Verwendung von fluorogenen Substraten getestet. Hierzu wurden ein fluorometrischer Test unter Verwendung des Substrates Carbobenuloxyl-Leu-Leyu-Val-Tyr-amino-methyl-coumarin durchgeführt.

[0142] (B) In einem weiteren Experiment wurden Verdünnungen von RPI und PR für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Freisetzung des Proteasom-Inhibitors aus dem Prodrug *in vitro*, in der Abwesenheit weiterer Zellbestandteile, wurde unter Verwendung von gereinigtem 20S Proteasomen fluorometrisch bestimmt.

5 [0143] (C) In einem weiteren Versuch wurde die Zellaufnahme von TPI-Substanzen untersucht, welche mittels Alexa-488 Fluoreszenz-markiert wurden. Die Auswertung erfolgt mittels Durchflusszytometrie sowie mittels Fluoreszenzmikroskopie.

[0144] (D) In einem weiteren Versuch wurde die Zellaufnahme von TPI und deren spezifische Aktivierung in HIV-1-infizierten Zellen getestet. Dazu wurden akut infizierte T-Zellen mit
10 unterschiedlichen Konzentrationen an TD für 20 Stunden inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die gleiche Behandlung in nicht infizierten Zellen. Zur Bestimmung der Proteasom-Inhibierung wurden Zelllysate auf Akkumulation von poly-ubiquitinylierten Proteinen getestet. Hierzu wurden gleiche Proteinkonzentrationen von Zelllysaten in einer 8%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit anti-Ubiquitin-Antikörpern gefärbt. Zur Kontrolle der
15 Inhibierung der HIV-1 Gag-Prozessierung und der Virusfreisetzung wurden HIV-1-infizierte T-Zellen für 20 Stunden mit TPI behandelt, und anschließend wurden Pulse/Chase-Experimente ähnlich dem in Figur 4 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Beispiel 11: Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) inhibieren die Prozessierung der Gag-Polypoteine und die Freisetzung von HIV-1 Viruspartikeln
20

[0145] Für die Analyse der inhibitorischen Wirkung von TAI-Substanzen auf die Reifung und die Freisetzung von HIV-1 Wildtyp Viren wurden Western-Blot- und Pulse/Chase-Kinetik-Analysen durchgeführt. Die TAI-Substanzen wurden nach Standard-Methoden der Peptidsynthese wie oben hergestellt und gereinigt. In einer bevorzugten Ausführung wurden
25 dabei folgende Peptide hergestellt:

- Das TAI-Peptid

G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRPE²⁰PTAPPE²⁷

welches die Wildtyp-Sequenz der L-Domäne des p6^{Gag}-Proteins von HIV-1 enthält, und das

- Kontroll-Peptid

0 G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRAE²⁰ATAAAE²⁷,

das in den für die Funktion der L-Domäne kritischen drei Aminosäurepositionen einen Austausch von Prolin nach Alanin enthält. Diese Sequenz kann nicht als L-Domäne fungieren. Daher kann das Kontroll-Peptid nicht das Budding von HIV beeinflussen.

[0146] Zum Zwecke der biochemischen Analyse der hemmenden Wirkung des TAI-Peptides auf die Kinetik der Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von HIV-1 wurden Pulse-Chase-Analysen durchgeführt. Ähnlich den in Beispiel 4 beschriebenen Verfahren wurden HeLa-Zellen mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 Wildtyp transfiziert, und 24 Stunden nach Transfektion wurde eine Pulse-Chase-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden parallele Kulturen der HIV-1 exprimierenden HeLa-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen Expression von HIV-Proteinen für 30 min einer Methionin-Depletion unterzogen, anschließend für 30 min mit [³⁵S]-markiertem Methionin metabolisch Puls-markiert und nachfolgend in einem Chase-Medium mit einem Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Methionin für einen Zeitraum von 8 Stunden inkubiert. Die Behandlung mit TAI-Peptiden begann mit dem Zeitpunkt der Methionin-Depletion und wurde über den gesamten Versuchszeitraum (Depletions-, Puls-, und Chase-Phase) aufrecht erhalten. Dazu wurden zu dem Kulturmedium 10 µM des vorher in Wasser gelösten Peptides

G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRPE²⁰PTAPPE²⁷

sowie zu der anderen Kultur 10 µM des Kontroll-Peptides

G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRAE²⁰ATAAAE²⁷

gegeben. Die Peptid-Behandlung wurde in allen Kulturlösungen im gesamten Verlauf des Experimentes aufrecht erhalten. Aliquote Zellkulturen wurden zu jedem Zeitpunkt des Chases gewonnen und durch Zentrifugation in Zell-, Virus- und Zellkulturüberstand-Fractionen aufgetrennt. Die radioaktiv markierten HIV-Proteine wurden mittels Standard-Immunpräzipitation unter Verwendung von AIDS-Patientenseren sowie Gag-spezifischen Antikörpern und unter Einsatz von bereits beschriebenen Methoden (Schubert *et al.*, 2000) isoliert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image-Analyse. Die Kinetiken der intrazellulären Gag-Prozessierung sowie der Freisetzung von Viruspartikeln wurde wie in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt. Wie in Figur 5 deutlich zu erkennen ist, bewirkt die Behandlung mit TAI-Peptiden eine deutliche Akkumulation unvollständiger Spaltprodukte des Gag-Polypeptin-Vorläuferproteins Pr55. Die Quantifizierung der Gag-Prozessierung ergibt, dass das TAI-Peptid eine zwei- bis dreifache Reduktion der Gag-Prozessierung im gesamten Zeitrahmen der Chase-Periode bewirken. Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass in den mit TAI-Peptid behandelten Kulturen die Freisetzung der Viruspartikeln deutlich verzögert ist. Diese Phänomene treten nicht für die Kulturen auf, welche mit dem Kontroll-Peptid behandelt wurden. In diesen Kulturen entspricht die Kinetik der Gag-Prozessierung und der Virusfreisetzung der einer Wildtyp-Situation. Da beide Peptide, das Kontroll- und das TAI-Peptid, sich nur in drei

Aminosäurepositionen innerhalb der HIV-1 L-Domäne unterscheiden, kann die inhibitorische Wirkung des TAI-Inhibitors nicht auf eine unspezifische Aktivität des Peptides selbst, sondern nur auf die erfindungsgemäß beschriebene kompetitive Blockierung der HIV-1 L-Domäne in assemblierenden HIV-1-Viruspartikeln zurückgeführt werden. Damit konnte die Prinzipiöslösung
5 für die neuartigen TAI-Moleküle erbracht werden.

Legende zu den Figuren

Figur 1: Funktionsweise der Pro-Drug-Aktivierung eines TPI.

[0147] Nach Zellaufnahme (Transduktion der Zellmembran) wird im Zytosol durch die Wirkung
10 einer für die Targetzelle spezifischen Protease, vorzugsweise der HIV-1-Protease, das Effektormolekül aus dem Pro-Drug TPI-Molekül durch Proteolyse freigesetzt.

Abkürzungen:

TD = transduzierende Domäne; LD = Linker-Domäne; PS = Protease-Spaltstelle; EF = Effektor-
oder Proteasom-Inhibitor-domäne, R = Aldehyd-, Epoxyketon- oder Borsäuremodifizierung.

15

Figur 2:

(A) Spaltstellen der viralen Protease von HIV-1 in Gag-Pol-Polypeptiden.

[0148] Schematische Struktur der gag- und pol-Gene sowie der Polyproteine Pr55gag und
p180gag-pol.

20 (B) Konsensus-Sequenzen von HIV-1 Protease-Spaltstellen in Gag- und Gag-Pol-Polypeptiden
in der Region P4-P4' mit Angabe der Kinetik-Konstanten der Proteolyse (nach Mascher et al.,
1996).

Nomenklatur: MA = Matrix, CA = Kapsid, NC = Nukleokapsid, PR = Protease, RT = Reverse
Transkriptase; RH = RNase H-Domäne von RT; IN = Integrase; p1 und p2 = kleine Spacer-
25 Peptide; p6 = p6^{gag} = C-terminale Domäne von Pr55, p6* = Transframe-Region.

Minus-1 ribosomales Frameshift am C-Terminus von NC resultiert in der Expression des p180^{gag-pol}-
Polyproteins (5% der Häufigkeit der Expression von Pr55^{gag}). Bekannte Affinitäten und
Enzymaktivitäten der Protease zu den jeweiligen Protease-Erkennungsstellen sind rechts
angegeben.

30

Spalt- Sequenz	P4 P3 P2 P1 P1' P2' P3' P4'	K_m (s ⁻¹)	K_m (mM)	K_m/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
MA-CA	SQNY*PIVQ	23	3.75	6.2
CA-P2	ARVL*A EAM	2.6	0.37	6.9
P2-NC	ATIM*MQRG	41	3.0	14
NC-P1	RQAN*FLGK	--	--	--
P1-p6	PGNF*LQSR	0.25	>5	0.05
P6*-PR	SFNF*PQIT	43	4	11
PR-RT	TLNF*PISP	20	3	7
RT-RH	AETF*YVDG	1.8	0.1	10

C_m = Ribosomale Frameshift Sequenz; MA= Matrix; CA = Kapsid; NC = Nukleokapsid; PR = Protease; RT = Reverse Transkriptase; RH = RNaseH; IN = Integrase; P1/P2 = Spacer Peptide; p6 = C-terminale Domäne von Pr55; p6* = Transframe-Region.

Figur 3: Proteasom-Inhibitoren induzieren raschen Zelltod (Apoptose) in Kulturen von HIV-1-infizierten T-Zellen.

- 5 [0149] Eine Kultur von CD4⁺ T-Zellen der Linie A3.01 wurde mit HIV-1 infiziert und die Zahl der lebenden Zellen zum Zeitpunkt des Mediumwechsels alle zwei Tage durch die Tryphanblau-Ausschluss-Methode bestimmt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation, am Tag 5 der Infektion, wurde die Kultur geteilt und ein Teil der Zellen in Gegenwart von 1 μ M des Proteasom-Inhibitors zLLL kontinuierlich weiter kultiviert.

10

Figur 4: Proteasom-Inhibitoren hemmen Virusfreisetzung von HIV-1 und HIV-1/EBOLA-Chimären.

- [0150] HeLa-Zellen wurden mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 Wildtyp (wt, oberer Abschnitt) sowie dem chimären Klon HIV/p6/PTAP (HIV-1NL4-3 + EBOLA L-Domäne, unterer Abschnitt) infiziert. Dieser chimäre Klon enthält die L-Domäne von EBOLA Vp40 Matrix-Protein in Form der Sequenz PTAPPEY, kloniert in die Region der L-Domäne von HIV-1NL4-3 innerhalb der kodierenden Region von p6gag (Martin-Serrano, 2001). Nach 24 Stunden wurden parallele Ansätze der transfizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren (10 microM zLLL und 10 microM LC (+INHIBITOREN)) im Medium oder ohne Inhibitoren (NO INHIBITOR) behandelt, und einem Pulse/Chase-Experiment unterzogen. Radioaktiv mit [35S]-Methionin markierte virale Proteine wurden mittels Immunpräzipitation aus der zellulären (Zelle) und den pelletierten Virus(VIRUS)-Fraktionen isoliert und in einer 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Positionen von dem Hauptprozessierungsprodukt Capsid (CA) sowie dem Gag-Precursor Pr55 und den Hüllproteinen gp160 und gp120 sind auf der linken Seite markiert. Nach Proteasom-Inhibierung tritt eine deutliche Verringerung der Virusfreisetzung sowie eine Verzögerung in der Gag-Prozessierung innerhalb des 8-stündigen Chase-Zeitraumes auf.

Ebenfalls ist die Akkumulation unvollständiger Spaltprodukte, wie zum Beispiel von p25CA, in den CELL-Fractionen deutlich zu erkennen (kürzere Exposition des Fluorogramms im Molekulargewichtsbereich 20 bis 30 kDa jeweils unter den Abschnitten dargestellt). Dieser hemmende Effekt der Proteasom-Inhibitoren ist spezifisch für die Prozessierung der Gag-
5 Strukturproteine. Die Expression und proteolytische Reifung der Hüllproteine gp160 und gp120 werden nicht von den Proteasom-Inhibitoren beeinflusst. Der Vergleich des oberen und des unteren Abschnittes lässt deutlich erkennen, dass die EBOLA-L-Domäne die Assemblierungsfunktion der L-Domäne von HIV-1 p6gag komplementiert und ähnlich Wildtyp HIV-1 auf die hemmende Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reagiert.

10

Figur 5: Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren (TAI) blockieren die Prozessierung der Gag-Polyproteine und die Freisetzung von HIV-1 Viruspartikeln in HIV-1 exprimierenden Zellen:

[0151] (A) HeLa-Zellen wurden mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 transfiziert. Nach 24 Stunden wurden parallele Ansätze der transfizierten Zellen jeweils mit 10
15 µM entweder des TAI-Peptides

(G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRPE²⁰PTAPPE²⁷)

oder des Kontroll-Peptides

(G¹RRRRRRRRR¹⁰PPQ-GGG-SRAE²⁰ATAAAE²⁷)

behandelt und einem Puls/Chase-Experiment unterzogen. Radioaktiv mit [³⁵S]-Methionin
20 markierte virale Proteine wurden mittels Immunpräzipitation aus der zellulären (Zelle) und dem pelletierten Virus (VIRUS) isoliert und in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die relative Konzentration dieser Proteine wurde mittels Image-Analyse quantitativ ausgewertet. Positionen des Hauptprozessierungsproduktes p24^{CA}, des Gag-Polyproteins Pr55 sowie der Env-
5 Glykoproteine sind auf der linken Seite des Fluorogramms markiert. Die Kinetik der intrazellulären Gag-Prozessierung wurde als der Quotient der Mengen von CA durch Pr55 über den gesamten Chase-Zeitraum dargestellt. Es tritt eine deutliche, ca. 3-fache Verzögerung in der Gag-Prozessierung sowie der Virusfreisetzung innerhalb des 8-stündigen Chase-Zeitraumes auf.

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired Immunodeficiency Syndrome
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
5 ATCC	American Type Culture Collection
BIV	Bovine Immunodeficiency Virus – Rinder-Immundefizienzvirus
BLV	Bovine Leukemia Virus – Rinder-Leukämie-Virus
CA	Kapsid
CFTR	Cystische Fibrosis (proteasomaler Abbau des Transmembran Regulators CFTR)
10 CD4+	Glykoprotein / Zellrezeptor
CDK	Cyclin dependent Kinases
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EF	Effektor- oder Proteasom-Inhibitor-domäne
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus – Pferde-Anämie-Virus
15 FIV	Feline Immunodeficiency Virus – Katzen-Immundefizienzvirus
Gag	Gruppenspezifisches Antigen, Core Protein von Retroviren
HAART-	HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy)
HeLa-Zellen	ATCC: CCL2
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
20 HPV	Human Papilloma Virus – Humanes Papilloma-Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HIBO-Viren	HIV/EBOLA chimäre Viren
HTLV	Human T-Cell Leukemia Virus
IN	Integrase
25 kDa	Kilodalton (Maß für Molekulargewicht)
Ki	inhibitorische Konstante
LC	Lactacystin
LD	Linker-Domäne
MA	Matrix
30 MDa	Megadalton
MHC	Major Histocompatibility Complex – Major Histocompatibilitäts-Komplex
MPMV	Mason-Pfizer-Affen-Virus
MuLV	murines Leukämievirus
NC	Nukleokapsid

NF-	nuklearer Faktor kB (NF-kB)
NLVS	Proteasom-Inhibitor z-Leuzinyl-Leuzinyl-Leuzinyl-vinylsulfon (NLVS)
p1 und p2	kleine Spacer-Peptide
p6	p6 ^{agg} : C-terminale Domäne von Pr55
5 p6*	Transframe-Region
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PGPH	Postglutamyl-Peptid hydrolysierende
PI	Proteasom-Inhibitor
PR	Protease
10 PS	Protease-Spaltstelle
R (Fig. 1)	Aldehyd-, Epoxyketon- oder Borsäuremodifizierung
RH	RNase H-Domäne von RT
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
15 RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIV	Simian Immunodeficiency Virus – Affen-Immundefizienzvirus
TAI	Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren
20 Tat	Transaktivator of Transkription
TD	Transduzierende Domäne
Th-Zellen	CD4 ⁺ -T-Helferlymphozyten
TI / TI-	Trojanische Inhibitoren
T-Lymphozyten	Thymusabhängige oder -stämmige Lymphozyten
25 TNF	Tumornekrosefaktor
TPI	Trojanische Proteasom-Inhibitoren
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin/Proteasom-System
Vpr	HIV-1 Protein Vpr
10 VHF	virale(s) hämorrhagische(s) Fieber
VLP	Virus-ähnliche Partikel (virus like particles)
zLLL	Tripeptidaldehyd N-carbobenzoxyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-leucinal

Literaturverzeichnis

- Adams, J., Ma, Y., Stein, R., Baevsky, M., Greiner, L., and Plamondon, L. (1996) Boronic ester and acid compounds, synthesis and uses. US 1448.012TW01
- 5 Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, R.L., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.-T., Plamondon, L., Stein, R.L. (1998) Potent and selective inhibition of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**:333-338.
- 10 Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J. Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. (1999) Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**:2615-2622.
- Adams, J., Palombella, V.J., Elliot, P.J. (2000) Proteasome inhibition: a new strategy in cancer
15 treatment. *Investigational New drugs* **18**:109-121.
- Adams, J., Stein, R. (1996) Novel inhibitors of the proteasome and their therapeutic use in inflammation. *Annu. Rep. Med. Chem.* **31**:279-288.
- 10 Armignacco, O., Lauria, F.N., Puro, V., Macri, G., Petrecchia, A., Ippolito, G. (2001) The model of response to viral haemorrhagic fevers of the National Institute for Infectious Diseases "Lazzaro Spallanzani". *J Biol Regul Homeost Agents.* **15**:314-321
- Baldwin, A.S. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.
15 *Annu. Rev. Immunol.* **14**:649-683.
- Beck, Z.Q., Hervio, L., Dawson, P.E., Elder, J.H., Madsion, E.L. (2000) Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use of inhibitor development. *Virology* **274**:391-401.
- 10 Beer, B., Kurth, R., Bukreyev, A. (1999) Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Naturwissenschaften* **86**:8-17.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. (2000) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway:
15 Mode of action and clinical implications. *J. Cell. Biochem.* **77**:40-51.
- Condra, J.H., Schleif, W.A., Blahy, O.M., Gabryelski, L.J., Graham, D.J., Quintero, J.C., Rhodes, A., Robbins, H.L., Roth, E., Shivaprakash, M., *et al.* (1995) In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**:569-571.
- 0 Derossi, D., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **8**:84-87.
- Elliott, P.J., Pien, C.S., McCormack, T.A., Capman, I.D., Adams, J. (1999) Proteasome
5 inhibition: a novel mechanism to combat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**:294-300.
- Elliott, P.J., and Ross, J.S. (2001) The proteasome a new target for novel drug therapies. *Am J. Clin. Pathol.* **116**:637-646.

Erickson, J.W., Eissenstat, M.E. (1999) HIV protease as a target for the design of antiviral agents for AIDS. In "Proteases of infectious agents". (B. Dunn, ed.), pp1-60. Academic Press, San Diego, CA, USA.

- 5 Falnes, P.O. (2000) Design of toxins that can be activated by cell-specific proteases and their potential use in targeted cell killing. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:471-476.

Falnes, P.O., Welker, R., Kräusslich, H.G., Olsnes, S. (1999) Toxins that are activated by HIV type-1 protease through removal of a signal for degradation by the N-end-rule pathway. *Biochem. J.* **343**:199-207.

Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., Schreiber, S.L. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystein. *Science* **268**:726-731.

- 15 Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**:1189-1193.

Frankel, A., Man, S., Elliott, P., Adams, J., Kerbel, R.S. (2000) Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Res.* **6**:3719-3728.

Freed, E.O. (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1-15.

- 25 Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. (2001). *Cell* **107**:55-65

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**:5836-5840.

Harty, R.N., Brown, M.E., Wang, G., Huibregtse, J., Hayes, F.P. (2000) A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13871-13876.

Henklein, P., Bruns, K., Sherman, M.P., Tessmer, U., Licha, K., Kopp, J., de Noronha, C.M.C., Greene, W.C., Wray, V., Schubert, U. (2000) Functional and structural characterization of synthetic Vpr from HIV-1 that transduces cells, localizes to the nucleus and induces G2 cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **275**:32016-32026.

Hershko, A., Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* **67**:425-479.

Lightcap, E.S., McCormack, T.A., Pien, C.S., Chau, V., Adams, J., Elliott, P.J. (2000) Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin. Chem.* **46**:673-683.

Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., Langel, U. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**:99-103.

50 Maschera, B., Darby, G., Palu, G., Wright, L.L., Tisdale, M., Myers, R., Blair, E.D., Furfine, E.S. (1996) Human immunodeficiency virus. Mutations in the viral protease that confer resistance to

saquinavir increase the dissociation rate constant of the protease-saquinavir complex. *J. Biol. Chem.* 271:33231-33235.

Martin-Serrano, J., Zang, T., Bieniasz, P.D. (2001) HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7:1313-1319.

Miller, M.D., Hazuda, D.J. (2001) New antiretroviral agents: looking beyond protease and reverse transcriptase. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:35-39.

10

Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C.M. (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:10403-10408.

Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A., Dowdy, S.F. (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* 12:1449-1452.

Palombella, V.J., Conner, E.M., Fuseler, J.W., Destree, A., Davis, J.M., Laroux, F.S., Wolf, R.E., Huang, J., Brand, S., Elliott, P.J., Lazarus, D., McCormack, T., Parent, L., Stein, R., Adams, J., Grisham, M.B. (1998) Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15671-15676.

Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78:773-785.

Patnaik, A., Chau, V., Wills, J.W. (2000) Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13069-13074.

Phillips, J.B., Williams, A.J., Adams, J., Elliott, P.J., Tortella, F.C. (2000) Proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 31:1686-1693.

Rock, K.L., Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17:739-779.

Rowland-Jones, S., Pinheiro, S., Kaul, R. (2001) New insights into host factors in HIV-1 pathogenesis. *Cell* 104:473-476.

Schou, S., Hansen, A.K. (2000) Marburg and Ebola virus infections in laboratory non-human primates: a literature review. *Comp Med.* 50:108-123.

Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bannink, J.R. (2000b) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.

Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bannink, J.R., Kräusslich, H.-G., Yewdell, J.W. (2000a) Proteasome inhibition interferes with gag polypeptide processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13057-13062.

Stein, R.L., Melandri, F., Dick, L., (1996) Kinetic characterization of the chymotryptic activity of the 20S proteasome. *Biochemistry* **35**:3899-3908.

- 5 Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G., Göttlinger, H.G. (2000) A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13063-13068.

Takada, A., Kawaoka, Y. (2001) The pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever. *Trends Microbiol.* **9**:506-511.

- 10 Teicher, B.A., Ara, G., Herbst, R., Palombella, V.J., Adams, J. (1999) The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **5**:2638-2645.

- Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*
15 **267**:1456-1462.

Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L. (1994) Specificity of retroviral proteases: an analysis of viral and nonviral protein substrates. In "Methods of Enzymology" (L. C. Kuo and J.A. Shafer, eds.), Vol. 241, pp. 279-301. Academic Press, San Diego, CA.

- 20 Vogt, V. 2000 PNAS **97**: 12945-12947

- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid
25 molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13003-13008.

Wilson, J.A., Bosio, C.M., Hart, M.K. (2001) Ebola virus: the search for vaccines and treatments. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:1826-1841.

Patentansprüche

1. Trojanische Inhibitoren bestehend aus
 - 5 1.1. Trojanischen Proteasom-Inhibitoren (TPI) und/ oder
 - 1.2. Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren (TAI).
2. Trojanische Inhibitoren nach Anspruch 1, wobei
 - 2.1. die Trojanischen Proteasom-Inhibitoren aus einem Fusionat von Proteasom-Inhibitoren und
 - 10 trojanischen Peptiden und
 - 2.2. die Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren aus einem Fusionat von Assemblierungs-Inhibitoren und trojanischen Peptidenbestehen.
- 15 3. Trojanische Inhibitoren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass
 - 3.1. die Trojanische Proteasom-Inhibitoren aus je einer transduzierenden Domäne, je einer Linker-Domäne, je einer Effektor-Domäne und je einer Protease-Spaltstelle und
 - 3.2. die Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren aus je einer transduzierenden Domäne, je einer Linker-Domäne, und je einer Assemblierungs-Inhibitor-Domäne
- 20 bestehen.
4. Trojanische Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass
 - 4.1. die transduzierende Domäne aus einer 8 bis 15 Aminosäuren langen Sequenz besteht, welche die Fähigkeit zur Zelltransduktion besitzt
 - 25 4.2. die Linker-Domäne aus einer 3 bis 6 Aminosäuren langen Poly-Glycin-Sequenz besteht, welche die transduzierende Domäne mit der Spaltstelle für die virale Protease verbindet
 - 4.3. die Effektor-Domäne
 - 4.3.1. aus einer 2 bis 5 Aminosäuren langen Sequenz oder aus anderen Aminosäure-ähnlichen Molekülen besteht, die nach proteolytischer Freisetzung durch die virale Protease das eigentliche
 - 30 Effektor-Molekül, den Proteasom-Inhibitor, bilden, welcher eine oder alle enzymatischen Aktivitäten des 26S Proteasom-Partikels in der Targetzelle blockiert
 - 4.3.2. Modifizierungen der C-terminalen COOH-Gruppe enthält, welche die katalytische Threonin¹-Seitenkette der β -Untereinheit (lokalisiert im 20S katalytisch aktiven Core-Partikel im 26S Proteasom) entweder reversibel oder irreversibel blockieren
 - 35 4.3.3. eine freie Amino-Gruppe am N-Terminus enthält

4.4. die Protease-Spaltstelle aus einer 6 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz besteht, die eine Erkennungssequenz für virale, zelluläre oder für tumor-spezifische Proteasen enthält.

5. Trojanische Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 4.4., dadurch gekennzeichnet, dass die
5 Protease-Spaltstelle eine optimierte Erkennungssequenz für

5.1. virale Proteasen, die im Prozess des viralen Replikationszyklus durch virale Genexpression in der infizierten Zelle gebildet werden und virale Polypeptide spalten, wozu virale Proteasen aus der Familie der

5.1.1. *Retroviridae*, mit der Protease PR und anderen viralen Proteasen in Viren, wie

10 5.1.1.1. Human immunodeficiency virus Typ 1 und 2 (humane Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2)

5.1.1.2. Simian immunodeficiency virus (Affen-Immundefizienzviren, SIV)

5.1.1.3. Equine infectious anemia virus (alle Genus Lentivirus)

5.1.1.4. Human T-lymphotropic virus Typ 1 und 2 (HTLV-1 und HTLV-2, Genus

15 Deltaretrovirus)

5.1.1.5. Mason-Pfizer monkey virus (Genus Betaretrovirus) oder

5.1.1.6. Murine leukemia virus (Genus Gammaretrovirus)

5.1.2. *Picornaviridae* mit den Proteasen 2A und 3C sowie anderen viralen Proteasen in Viren, wie

20 5.1.2.1. Poliovirus (Genus Enterovirus)

5.1.2.2. Human rhinovirus A (Genus Rhinovirus) oder

5.1.2.3. Hepatitis-A-Virus (Genus Hepatovirus)

5.1.3. *Adenoviridae* mit der Adenovirusproteinase und anderen Cystein-Proteasen in Viren, wie Human adenovirus C (Genus Mastadenovirus);

25 5.1.4. *Asfarviridae* mit African swine fever virus Protease und anderen viralen Cystein-Proteasen in Viren wie African swine fever virus (Genus Asfivirus)

5.1.5. *Herpesviridae*, mit der HCMV-Protease und anderen viralen Serin-Proteasen in Viren, wie

5.1.5.1. Human cytomegalovirus (Betaherpesvirinae) oder

30 5.1.5.2. Pseudorabies virus (Alphaherpesvirinae)

5.1.6. *Birnaviridae* mit der viralen VP4-Protease sowie anderen viralen Serin-Proteasen in Viren, wie

5.1.6.1. Infectious bursal disease virus (Genus Avibirnavirus) oder

5.1.6.2. Infectious pancreatic necrosis virus (Genus Aquabirnavirus)

- 5.1.7. *Arteriviridae*, mit der Protease nsp4 und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Equine arteritis virus (Genus Arterivirus);
- 5.1.8. *Coronaviridae* mit den Proteasen "3C-ähnliche Protease", "Papain-ähnliche Cystein Protease 1", der Virusprotease "PCP-1", und anderen viralen Proteasen in Viren, wie
- 5 5.1.8.1. Avian coronavirus infectious bronchitis virus oder
- 5.1.8.2. Mouse hepatitis virus (alle Genus Coronavirus) sowie
- 5.1.9. *Togaviridae*, mit der Protease "nsP2" und anderen viralen Proteasen in Viren, wie Sinbis virus (Genus Alphavirus);
- 5.1.9.3. *Flaviviridae* mit Protease NS3 und anderen viralen Serin Protease in Viren, wie
- 10 5.1.9.4. Tick-borne encephalitis virus, Dengue virus, Yellow fever virus (alle Genus Flavivirus),
- 5.1.9.5. Hepatitis-C-Virus (Genus Hepacivirus)
- 5.1.10. *Filoviridae* als Erreger des hämorrhagischen Fiebers mit viralen Proteasen des Lassa-, Marburg-, Ebola- oder Krim/Kongo-Virus gehören
- oder für
- 15 5.2. zelluläre Proteasen, welche spezifisch in einer Krebszelle exprimiert werden oder wo die Expression und/oder die Aktivität in Krebszellen höher ist als in gesunden Zellen oder für
- 5.3. tumor-spezifische Proteasen
- enthält.
- 20 6. Trojanische Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 4.3.2., dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Modifizierungen der C-terminalen COOH-Gruppe um
- a) Borsäure-Strukturen oder
- b) Aldehyd-Strukturen oder
- c) Epoxyketon-Strukturen
- 25 oder andere chemische Modifizierungen handelt, welche spezifisch mit der katalytischen β -Untereinheit des Proteasoms in Wechselwirkung treten.
7. Verfahren zur Herstellung Trojanischer Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, dass ein Proteasom- oder ein Assemblierungs-Inhibitor mit einem trojanischen Peptid fusioniert wird.
- 30 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine transduzierende Domäne mit einer Protease-Spaltstelle über eine synthetische Linker-Domäne verbunden und eine Effektor-Domäne so hinzugefügt wird, dass diese nach proteolytischer Freisetzung durch eine spezifische

Protease in der Zielzelle das eigentliche Effektor-Molekül freisetzt und dadurch den wirksamen Proteasom-Inhibitor bildet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die proteolytische Freisetzung der Effektor-Domäne aus dem als Pro-Drug fungierenden inaktiven Vorläufermolekül mittels Targetzell-spezifischer Protease, vorzugsweise viraler Protease, erfolgt.

10. Verfahren nach Anspruch 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Aufnahme von TPI in die gewünschte Zielzelle unter Verwendung Zellmembran-transduzierender Eigenschaften mittels der trojanischen Peptide erfolgt und die Aktivierung des Pro-Drugs durch Proteolyse mittels spezifischer Protease oder einer viralen Protease erfolgt, welche die beiden aktiven Komponenten miteinander verbindet.

11. Verwendung von Trojanischen Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung von Arzneimitteln.

12. Verwendung nach Anspruch 11 für Trojanischen Proteasom-Inhibitoren zur

12.1. Behandlung von Virus-Infektionen

12.2. Behandlung von Erkrankungen, bei denen eine spezifische Protease exprimiert wird

20 12.3. Beeinflussung, Hemmung, Regulierung oder Blockierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway in der Zielzelle

12.4. Blockierung der Aktivität des Faktors NF- κ B

12.5. Verhinderung der Ausbreitung von Virusinfektionen im Organismus

12.6. Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren, Hepatitis- und
25 Filoviren

12.7. Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen.

13. Verwendung nach Anspruch 11 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

30 a) Spumaviren oder

b) Mammalian C-Typ Oncoviren oder

c) BLV (Bovine Leukemia Virus) oder

d) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) oder

e) Leukämieviren oder

- f) RSV (Rous-Sarcoma-Virus) oder
g) Lentiviren
gehemmt werden.
- 5 14. Verwendung nach Anspruch 13e, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und
Replikation von
a) BLV oder
b) HTLV-I oder
c) HTLV-II
10 gehemmt werden.
15. Verwendung nach Anspruch 13g, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und
Replikation von
a) Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) oder
15 b) Humanes Immundefizienzvirus Typ 2 (HIV-2) oder
c) Affen-Immundefizienzvirus (SIV) oder
d) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV)
e) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV)
gehemmt werden.
- 10 16. Verwendung nach Anspruch 15 a) und b)
16.1. zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS
16.2. zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS in fortgeschrittener Krankheitsphase.
- 5 17. Verwendung nach Anspruch 16 in Kombination mit
17.1. anderen anti-retroviralen Medikamenten
17.2. Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease
17.3. anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen
17.4. intrazellulärer Immunisierung
o 17.5. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen
und/oder peripheren CD4+-Lymphozyten
18. Verwendung nach Anspruch 16 zur

18.1. Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2 infizierten Personen

18.2. zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns

18.3. zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1-/HIV-2-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.

10

19. Verwendung von Trojanischen Proteasom-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 10 zur Behandlung und Vorbeugung von viralen hämorrhagischen Fiebern (VHF) in Menschen und Tieren, insbesondere in non-humanen Primaten (Affen).

15 20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Bekämpfung / Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit den Filoviren Ebolavirus, Marburgvirus, Lassavirus oder Krim/Kongo hämorrhagisches Fieber-Virus verursacht wurden.

20 21. Verwendung nach Anspruch 11 zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 11 als Pro-Drug.

23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass durch Einsatz transduzierender Inhibitoren die trojanischen Proteasom-Inhibitoren aufgrund der Zellmembran-transduzierenden Wirkung der trojanischen Peptid-Sequenzen, enthalten in den Pro-Drugs, die Blut-Hirnschranke überwinden und damit ebenfalls im neuronalen Gewebe aktiv werden und somit HIV-infizierte Zellen aus neuronalem Gewebe des Zentralnervensystems entfernt werden können.

10 24. Verwendung nach Anspruch 11 als "Drug-Delivery-System".

25. Verwendung nach den Ansprüchen 10 und 11 zur Blockierung des Ubiquitin/Proteasom-Pathway in bestimmten Targetzellen, wobei die Targetzellen Tumor-Zellen oder von Pathogenen befallene Wirtszellen sind.

26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Pathogene
- 26.1. Zellparasiten – Bakterien, Mykoplasmen, Pilze, Hefen und /oder andere pro- und eukaryotische Mikroorganismen –
- 5 26.2. Viren – Influenza-, Papilloma-, Herpes-, Filo- oder andere humanpathogene Viren sowie Immundefizienz auslösende Lentiviren sein können.
27. Verwendung nach Anspruch 11 zur Beeinflussung von Zielzellen in ihren zellulären Mechanismen: Zellteilung, Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Zelltod (Apoptose), Zellaktivierung,
- 10 Signaltransduktion oder Antigenprozessierung.
28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen.
29. Verwendung nach Anspruch 27 zur Auslösung eines anti-neoplastischen Effektes durch
- 15 Beeinflussung der Zellteilung in Tumorzellen.
30. Verwendung nach Anspruch 11 zur Herstellung von Mitteln zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Filoviren, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame Komponente mindestens einen Proteasom-Inhibitor und / oder mindestens einen Trojanischen
- 20 Proteasom-Inhibitor in einer pharmazeutischen Zubereitung enthalten.
31. Verwendung nach Anspruch 30 zur Behandlung von viralem hämorrhagischen Fieber, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die als Proteasom-Inhibitoren von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach
- 25 Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms - die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten - innerhalb des 26S oder auch des 20S Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.
32. Verwendung nach Anspruch 30 und 31, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutischen Zubereitungen neben Proteasom-Inhibitoren auch andere Mittel enthalten, die das zelluläre Ubiquitin-System beeinflussen, regulieren oder hemmen, wie die Aktivitäten
- 32.1. der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und/oder
- 32.2. der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme

32.3. von zellulären Faktoren, die mit Ubiquitin in Wechselwirkung treten

32.4. von zellulären Faktoren, die mit Ubiquitin als

32.4.1. Mono-Ubiquitin-oder als

32.4.2. Poly-Ubiquitin

5 in Wechselwirkung treten.

33. Verwendung nach Anspruch 30 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen in vivo oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zellspezifität-tragende
10 Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

15 34. Verwendung nach Anspruch 30 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die

a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder

b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen

10 c) total-synthetisch hergestellt werden

d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden

e) durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder

f) in Mikroorganismen hergestellt werden.

15 35. Verwendung nach Anspruch 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen angehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten

- β -Lacton-Derivate

0 - Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),

- Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clastolactacystein β -Lacton"

b) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:

- modifizierte Peptidaldehyde wie N-carbobenzoxy-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxy-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyl-L-Leuziny-L-Leuziny-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxy-Ile-Glu(OBut)-Ala-Carbobenzoxy-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);
- 5 c) Peptide, welche C-terminal eine α,β -Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinyl-sulfone wie
- 35.c)1. Carbobenzoxy-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-sulfon oder
- 35.c)2. 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-
- 10 sulfon (NLVS)
- d) Glyoxal- oder Borsäure-Reste wie
- 35.d)1. Pyrazyl-CONH(CHPhe)CONH(CHisobutyl)B(OH)₂ sowie
- 35.d)2. Dipeptidyl-Borsäure-Derivate
- oder
- 15 e) Pinacol-Ester - wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.
36. Verwendung nach Anspruch 30 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren die Epoxyketone
- 36.1. Epoxomicin (Epoxomicin, Molekülformel: C₂₈H₈₆N₄O₇) und/oder
- 20 36.2. Eponemicin (Eponemicin, Molekülformel: C₂₀H₃₆N₂O₅)
- eingesetzt werden.
37. Verwendung nach Anspruch 30 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen
- 25 37.1. PS-519 als β -Lacton- sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione - Molekülformel C₁₂H₁₉NO₄ - und/oder
- 37.2. PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazincarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure - Molekülformel C₁₉H₂₅BN₄O₄ - und/oder
- 30 37.3. PS-273 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder
- 37.4 die Verbindung PS-296 (8-Quinoly-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder
- 37.5. PS-303 (NH₂(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

37.6. PS-321 als (Morpholin-CONH-(CH-Napthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)₂); -
und/oder

37.7. PS-334 (CH₃-NH-(CH-Napthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

37.8 die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-*homo*-Phenylalanin)-CONH-(CH-
isobutyl)-B(OH)₂) und/oder

37.9. PS-352 (Phenylalanin-CH₂-CH₂-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-
B(OH)₂) und/oder

37.10. PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH_pF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)₂)
eingesetzt werden.

10

38. Verwendung nach Anspruch 30 zur

38.1. Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im
Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen Filoviren-infizierten Personen

38.2. Verhinderung der Etablierung einer systemischen Filoviren-Infektion unmittelbar nach
Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Filoviren-
kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.

39. Verwendung nach Anspruch 30 als Mittel zur Beeinflussung der enzymatischen Aktivitäten
des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen
Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur.

40. Verwendung nach Anspruch 30 zur Induktion der Apoptose von Virus-infizierten Zellen,
speziell in Filoviren-infizierten Zellen.

41. Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die transduzierende Domäne aus einer 8 bis 15 Aminosäuren langen Sequenz besteht,
welche die Fähigkeit zur Zelltransduktion besitzt.

42. Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die Linker-Domäne aus einer 3 bis 6 Aminosäuren langen Poly-Glycin-Sequenz besteht,
welche die transduzierende Domäne mit der Assemblierungs-Inhibitor-Domäne verbindet.

43. Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die Assemblierungs-Inhibitor-Domäne aus einer 4 bis 10 Aminosäuren langen Sequenz

besteht, welche eine späte (late, L) Assemblierungsdomäne von viralen Strukturproteinen enthält, wozu zählen:

- a) die Aminosäuresequenz P-T-A-P des p6^{Gag}-Proteins des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1);
- 5 b) die Aminosäuresequenz P-P-P-Y des p12^{Gag}-Proteins des murinen Leukämievirus (MuLV);
- c) die Aminosäuresequenz Y-P-D-L des p9^{Gag} des Pferde-Anämie-Virus (EIAV);
- d) die Aminosäuresequenz P-T-A-P-P-E-Y des VP40 Matrix-Proteins von Ebola-Virus;
- e) die Aminosäuresequenz P-P-x-Y (x steht für eine beliebige Aminosäure) des Rous-Sarcoma-Virus (RSV) des Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV) sowie des MuLV.

0

44. Trojanische Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als die Effektor-Domäne die Assemblierungs-Inhibitor-Domäne während oder unmittelbar nach Zellaufnahme die Wechselwirkung von viralen Strukturproteinen mit zellulären Faktoren, wie zellulären Proteinen und Enzymen, blockiert, wozu zählen:

- 5 a) zelluläre Chaperone und Faltungsenzyme, welche an virale L-Domänen binden;
- b) zelluläre Protein-modifizierende Enzyme, wie Proteasen, Phosphatasen, Kinasen;
- c) zelluläre Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems, wie Ubiquitin-Ligase und/oder Ubiquitin-Hydrolasen;
- d) zelluläre Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems, welche insbesondere die Mono-
- 10 Ubiquitylierung der L-Domäne enthaltenden viralen Strukturproteine blockieren.

45. Verwendung von Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 3 und 41 bis 44 zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung von Virus-Infektionen.

15 46. Verwendung nach Anspruch 45 als Mittel zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren.

47. Verwendung nach Anspruch 45 und 46, dadurch gekennzeichnet, dass die späten Prozesse im Replikationszyklus von Retroviren gehemmt werden.

10

48. Verwendung von Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 45 in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren.

49. Verwendung von Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 45 bis 48, dadurch gekennzeichnet, dass im Falle von Retroviren die proteolytische Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease gehemmt wird.

50. Verwendung nach Anspruch 45 bis 49, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Spumaviren oder
 - b) Mammalian C-Typ Oncoviren oder
 - c) BLV (Bovine Leukemia Virus) oder
 - 10 d) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) oder
 - e) Leukämieviren oder
 - f) RSV (Rous-Sarcoma-Virus) oder
 - g) Lentiviren
- gehemmt werden.

15

51. Verwendung nach Anspruch 50e, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) BLV oder
 - b) HTLV-I oder
 - 20 c) HTLV-II
- gehemmt werden.

52. Verwendung nach Anspruch 50g, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- 25 a) Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) oder
 - b) Humanes Immundefizienzvirus Typ 2 (HIV-2) oder
 - c) Affen-Immundefizienzvirus (SIV) oder
 - d) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV)
 - e) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV)
- 30 gehemmt werden.

53. Verwendung von Trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren nach Anspruch 45 bis 48 zur Bekämpfung / Behandlung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit Retroviren verursacht wurden.



54. Verwendung nach Anspruch 53 zur Bekämpfung / Behandlung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch
- 54.1. Infektionen mit Leukämieviren
- 5 54.2. humane T-Zell Leukämieviren HTLV-I und HTLV-II.
- 54.3. Infektionen mit Lentiviren
- verursacht wurden.
55. Verwendung nach Anspruch 54.3 zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS.
- 10 56. Verwendung nach Anspruch 55 in Kombination mit
- 56.1. anderen anti-retroviralen Medikamenten
- 56.2. Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease
- 56.3. anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen
- 15 56.4. intrazellulärer Immunisierung
- 56.5. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und/oder peripheren CD4+-Lymphozyten
57. Verwendung nach Anspruch 55 zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS in fortgeschrittener
- 20 Krankheitsphase.
58. Verwendung nach Anspruch 55 zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2 infizierten Personen.
- 15 59. Verwendung nach Anspruch 55 zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns.
- 30 60. Verwendung nach Anspruch 55 zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1/HIV-2 Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.

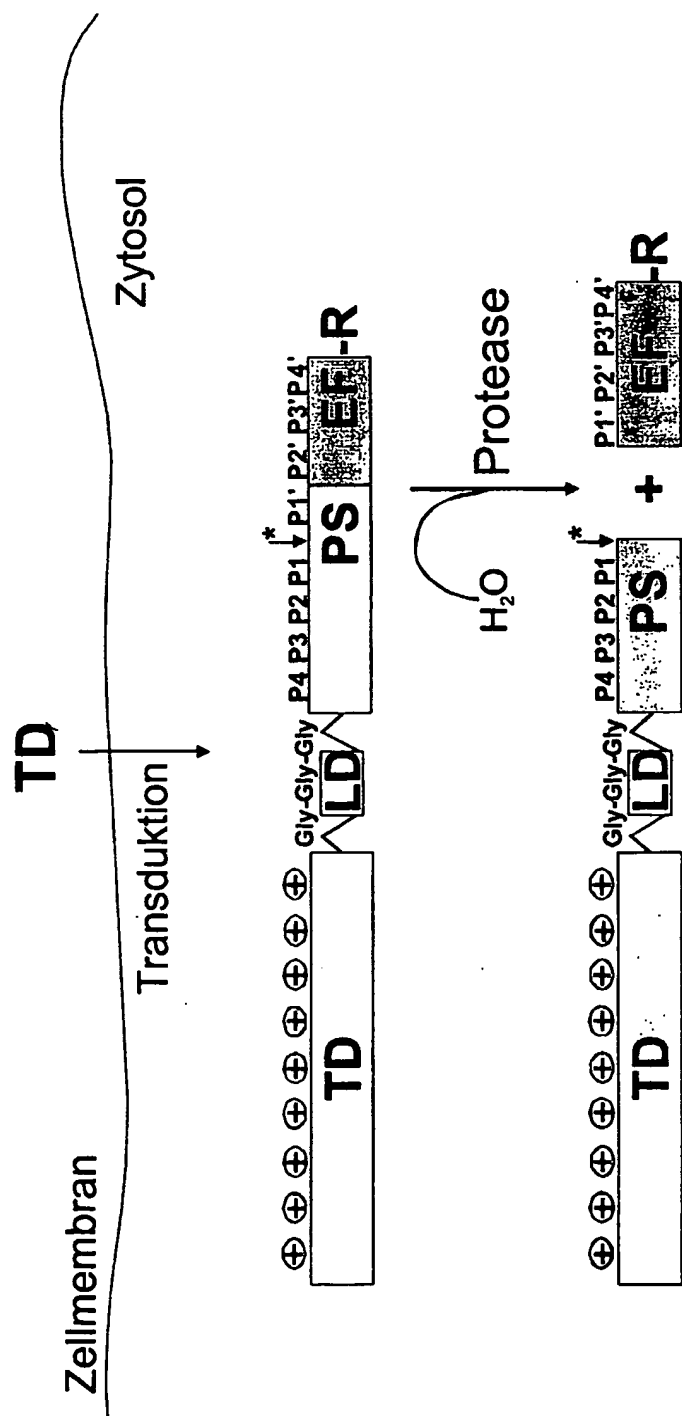


61. Verwendung von trojanischen Assemblierungs-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 3 und 41 bis 44 zur Behandlung und Vorbeugung von viralen hämorrhagischen Fiebern (VHF) in Menschen und Tieren, insbesondere in non-humanen Primaten (Affen).
- 5 62. Verwendung nach Anspruch 61 zur Bekämpfung / Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit den Filoviren Ebolavirus und Marburgvirus verursacht wurden.
- 10 63. Verwendung nach Anspruch 61 zur Bekämpfung / Behandlung und Vorbeugung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit Lassa-Virus oder Krim/Kongo hämorrhagischen Fieber Virus verursacht wurden.



Figur 1

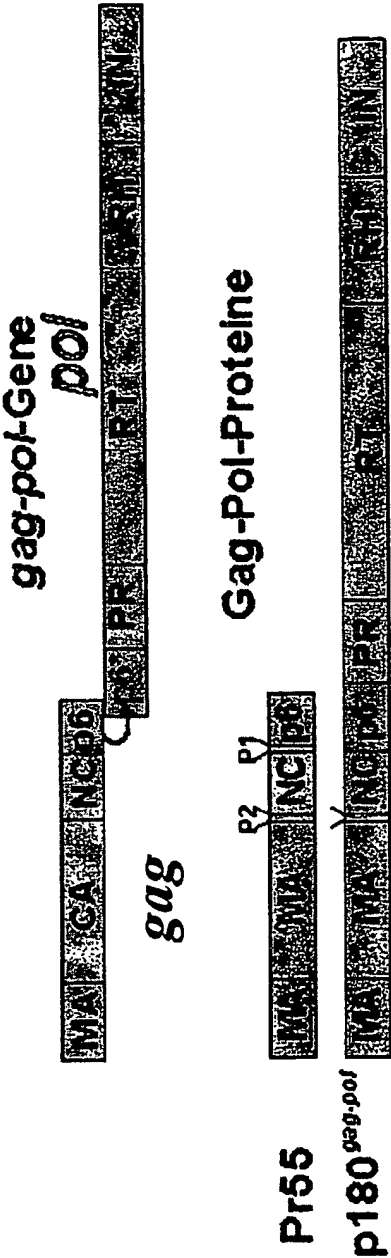
1/5





Figur 2

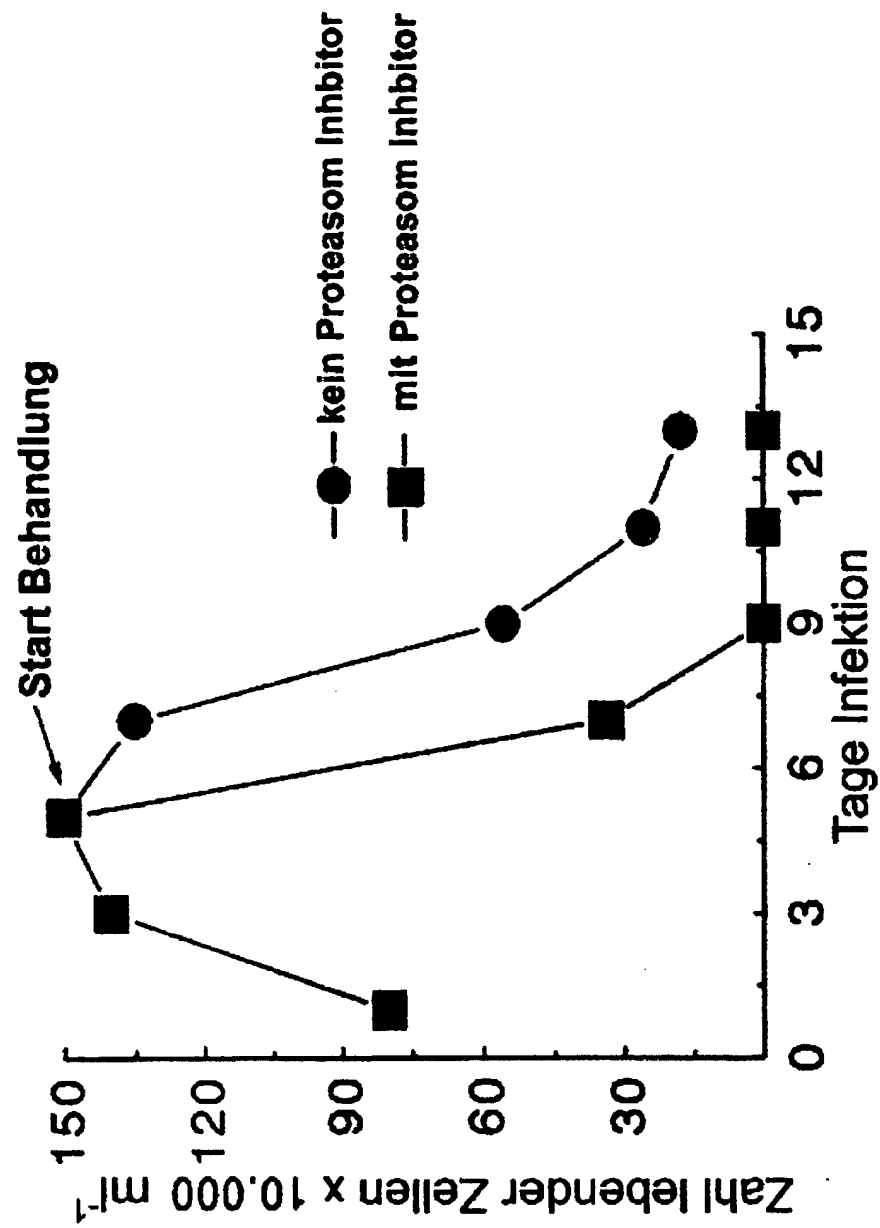
2/5





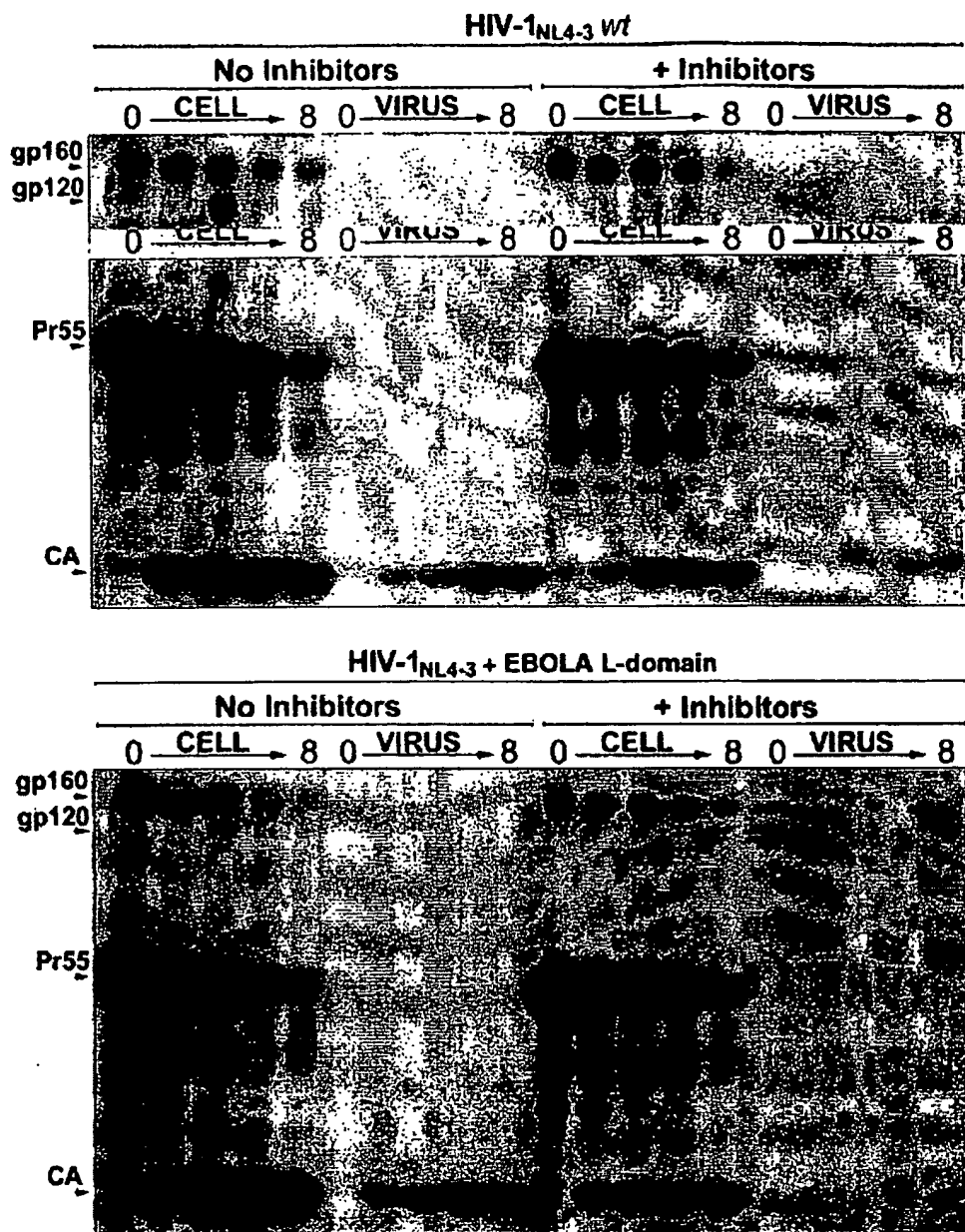
Figur 3

3/5



Figur 4

4/5



Figur 5

5/5

